



Filipa Alexandra Raposo Rosa

Licenciada em Engenharia Química e Bioquímica

Aplicação de Desenho de Experiências na Otimização do Teor Proteico na Maltagem do Trigo Sarraceno

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Prof.^a Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de
Matos, Professora Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientadora: Doutora Carla Motta, INSA

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente(s): Professora Doutora Helena Maria
Pereira Pinto Dourado e Alvelos
Vogal(ais): Professora Doutora Ana Sofia
Leonardo Vilela de Matos



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2019

Copyright © 2019 - Filipa Rosa - FCT/UNL - UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Ana Sofia Matos pelo apoio prestado ao longo da dissertação, através da disponibilidade, sugestões e transmissão de conhecimento. Quero agradecer também à Doutora Carla Mota pela oportunidade de realizar a dissertação no Instituto Ricardo Jorge e pela ajuda concedida durante a fase experimental e à Professora Ana Ramos por todo o conhecimento facultado.

Gostaria igualmente de agradecer aos amigos e colegas de curso pelo apoio e convivência.

Em último lugar agradeço à minha família que me proporcionou este percurso académico, e pela educação e valores transmitidos.

Resumo

Com a crescente consciencialização e procura por um estilo de vida mais saudável, é cada vez maior a procura por alimentos mais ricos nutricionalmente e que demonstrem ainda benefícios adicionais para a saúde humana, como os denominados alimentos funcionais. O trigo sarraceno é uma reconhecida fonte de nutrientes, dotado de amido resistente, que proporciona um alto teor de hidratos de carbono, e rico em proteína, vitaminas, minerais e principalmente fibra, prevenindo situações de obstipação e obesidade. Devido à ausência de glúten na sua composição, é utilizado como substituto dos cereais na dieta de pacientes celíacos a fim de evitar desequilíbrios nutricionais, sendo recomendado pela Organização Mundial de Gastroenterologia para pacientes que sofrem da doença.

O processo de maltagem é uma das formas de processamento mais promissoras na melhoria da qualidade proteica dos alimentos e, por isso, o foco deste estudo será a otimização do teor proteico e respetivos aminoácidos essenciais durante o mesmo. Com este objetivo e numa fase inicial, determinou-se o tempo de demolha necessário para obter um teor de humidade de 50%, de modo a que se dê a absorção adequada de água, e o tempo de secagem até um teor inferior a 10% para que terminem os processos metabólicos que se iniciaram durante a germinação. Numa segunda fase, aplicou-se desenho de experiências com 2 fatores, tempo (h) e temperatura de germinação (°C), a 3 níveis em 2 blocos, duas temperaturas de demolha (°C). De modo a selecionar os fatores significativos e a melhor combinação de níveis, recorreu-se à análise de variância e às superfícies de resposta, respetivamente.

Verificou-se que são necessárias 2h de demolha e 4h de secagem para atingir os teores de humidade desejados. Relativamente às características analisadas através do desenho de experiências, observou-se que para o teor proteico apenas a temperatura de demolha é significativa, com valores mais elevados para uma temperatura de 30 °C. Relativamente aos aminoácidos essenciais, com exceção da metionina, cujos fatores significativos são o tempo e a temperatura de germinação, sendo a melhor combinação uma temperatura de 18 °C e um tempo de 72 h, para os restantes aminoácidos apenas o tempo de germinação é significativo, com melhores resultados para uma germinação com a duração de 48 h.

Palavras-chave: Trigo sarraceno, Aminoácidos, Proteína, Análise de variância, Desenho de experiências

Abstract

With increasing awareness and an interest for a healthier lifestyle, the demand for nutritionally richer foods that also demonstrate additional benefits to human health, such as functional foods, is growing fast. Buckwheat is a recognized source of nutrients, gifted with resistant starch, which provides a high content of carbohydrates, and rich in protein, vitamins, minerals and mainly fiber, preventing situations of constipation and obesity. Due to the absence of gluten in its composition, it is used as a substitute for cereals in the diet of celiac patients to avoid nutritional imbalances, being recommended by the World Gastroenterology Organization.

The malting process is one of the most promising forms of processing in the improvement of the protein quality of food and, therefore, the focus of this study will be the optimization of buckwheat protein content and its essential amino acids. The soaking time was determined once is needed a moisture content of 50% to obtain an adequate absorption of water and so was the drying time to guarantee a moisture content less than 10% in order to end the metabolic activity of the grain. Design of experiments was applied to optimize the malting process, with 2 factors, time (h) and germination temperature (°C) at 3 levels in 2 blocks, two different soaking temperatures (°C). The significant factors and the best combination of levels were determined using the analysis of variance and the response surfaces.

To obtain the desired moisture content, 2h of soaking and 4h of drying are necessary. Regarding the statistical analysis, it was found that for the protein content only the temperature of the soaking is significant, with higher values for a temperature of 30 °C. For essential amino acids, the exception is methionine, whose significant factors are time and temperature of germination, with the best combination being a temperature of 18 °C and a time of 72 h. For the remaining amino acids, the germination time is the only significant factor, with better results for a germination with the duration of 48 h.

Keywords: Buckwheat, Protein, Amino Acids, Analysis of Variance, Design of Experiments

Índice

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
SIMBOLOGIA	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	1
1.3 INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DOUTOR RICARDO JORGE – INSA	2
1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	3
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1 TRIGO SARRACENO	5
2.1.1 Características	5
2.1.2 Origem e produção	7
2.1.3 Tipos de trigo sarraceno	9
2.1.4 Trigo sarraceno na Europa	10
2.2 IMPORTÂNCIA DO TRIGO SARRACENO NA ALIMENTAÇÃO	10
2.2.1 Alimentos funcionais	10
2.2.2 Importância na doença celíaca	13
2.2.3 Conteúdo proteico e estrutura de aminoácidos	15
2.3 PROCESSAMENTO DO TRIGO SARRACENO	17
2.3.1 Maltagem	17
2.3.2 Impacto nutricional da maltagem	18
2.3.3 Otimização das condições de maltagem	19
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
2.4.1 Desenho de experiências	20
2.4.2 Análise da variância	22
2.4.3 Verificação dos pressupostos da análise da variância	24
3. METODOLOGIA, MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 MALTAGEM	25
3.1.1 Demolha	25

3.1.2	<i>Germinação</i>	26
3.1.3	<i>Secagem</i>	27
3.2	DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL	27
3.3	QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	29
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3.5	CONTROLO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS GERMINADOS	31
4.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	33
4.1	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DEMOLHA	33
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SECAGEM	34
4.3	PROTEÍNA	35
4.3.1	<i>Proteína total</i>	35
4.3.2	<i>Análise comparativa entre a proteína total e a soma dos aminoácidos</i>	36
4.4	AMINOÁCIDOS	37
4.4.1	<i>Análise comparativa entre trigo sarraceno cru e maltado</i>	37
4.4.2	<i>Análise comparativa entre temperaturas de demolha</i>	38
4.4.3	<i>Análise comparativa entre temperatura e tempo de germinação</i>	39
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.5.1	<i>Análise da variância</i>	42
4.5.2	<i>Análise dos pressupostos da variância</i>	48
4.6	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	51
5.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	55
5.1	CONCLUSÕES	55
5.2	RECOMENDAÇÕES	57
6.	BIBLIOGRAFIA	59
7.	ANEXOS	65
ANEXO I	– PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE	65
ANEXO II	– PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO DO MÉTODO KJELDAHL	67
ANEXO III	– PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS	70
ANEXO IV	– RESPOSTAS OBTIDAS PARA A PROTEÍNA TOTAL E AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS	74
ANEXO V	– ANÁLISE DOS PRESSUPOSTOS DA VARIÂNCIA	83
ANEXO VI	– ANOVA, ANOVA CONDENSADA E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA	97
ANEXO VII	– CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS ENQUANTO PARÂMETRO DE CONTROLO DA QUALIDADE	106

Índice de figuras

Figura 2.1 - Exemplo do desenvolvimento da planta de trigo sarraceno	6
Figura 2.2 - Área de cultivo de trigo sarraceno	8
Figura 2.3 - Estrutura da Rutina	12
Figura 2.4 - Diferentes fases da secagem	18
Figura 3.1 - Demolha do grão de trigo sarraceno	25
Figura 3.2 - Esquema do procedimento realizado	26
Figura 3.3 - Grãos de trigo sarraceno germinados	27
Figura 3.4 - Grãos de trigo sarraceno maltados	27
Figura 3.5 - Digestão de compostos orgânicos com azoto (Início)	28
Figura 3.6 - Digestão de compostos orgânicos com azoto (Fim)	28
Figura 3.7 - Destilação de compostos orgânicos com sulfato de amónio	28
Figura 3.8 - Equipamento utilizado na aplicação do método Kjeldahl	29
Figura 3.9 - Filtração dos hidrolisados	30
Figura 3.10 - Placas de Petri após inoculação	32
Figura 4.1 - Evolução do teor de humidade durante a demolha	33
Figura 4.2 - Evolução do teor de humidade durante a secagem	35
Figura 4.3 - Superfície de resposta para a Metionina	44
Figura 4.4 - Verificação de Box-Cox para a proteína total	49
Figura 4.5 - Verificação da normalidade para a metionina (Valores expectáveis normalizados vs resíduos)	50
Figura 4.6 - Verificação da homogeneidade da variância (Valores previstos vs resíduos)	50
Figura 4.7 - Evolução do número de microrganismos a uma demolha de 20 °C	52
Figura 4.8 - Evolução do número de microrganismos a uma demolha de 30°C	53
Figura V.1 - Verificação de Box-Cox para a proteína (enquanto soma dos AA)	83
Figura V.2 - Verificação da normalidade para a proteína (enquanto soma dos AA)	83
Figura V.3 - Verificação da homogeneidade da variância para a proteína (enquanto soma dos AA)	84
Figura V.4 - Verificação de Box-Cox para a histidina	84
Figura V.5 - Verificação da normalidade para a histidina	85
Figura V.6 - Verificação da homogeneidade da variância para a histidina	85
Figura V.7 - Verificação de Box-Cox para a histidina	86
Figura V.8 - Verificação da normalidade para a treonina	86
Figura V.9 - Verificação da homogeneidade da variância para a treonina	87
Figura V.10 - Verificação de Box-Cox para a lisina	87
Figura V.11 - Verificação da normalidade para a lisina	88
Figura V.12 - Verificação da homogeneidade da variância para a lisina	88
Figura V.13 - Verificação de Box-Cox para a metionina	89
Figura V.14 - Verificação da normalidade para a metionina	89

Figura V.15 - Verificação da homogeneidade da variância para a metionina	90
Figura V.16 - Verificação de Box-Cox para a valina	90
Figura V.17 - Verificação da normalidade para a valina	91
Figura V.18 - Verificação da homogeneidade da variância para a valina	91
Figura V.19 - Verificação de Box-Cox para a isoleucina	92
Figura V.20 - Verificação da normalidade para a isoleucina	92
Figura V.21 - Verificação da homogeneidade da variância para a isoleucina	93
Figura V.22 - Verificação de Box-Cox para a leucina	93
Figura V.23 - Verificação da normalidade para a leucina	94
Figura V.24 - Verificação da homogeneidade da variância para a leucina	94
Figura V.25 - Verificação de Box-Cox para a fenilalanina	95
Figura V.26 - Verificação da normalidade para a fenilalanina	95
Figura V.27 - Verificação da homogeneidade da variância para a fenilalanina	96
Figura VI.1 - Superfície de resposta para a proteína total	97
Figura VI.2 - Superfície de resposta para a proteína total (enquanto soma dos AA)	99
Figura VI.3 - Superfície de resposta para a treonina	100
Figura VI.4 - Superfície de resposta para a lisina	101
Figura VI.5 - Superfície de resposta para a valina	102
Figura VI.6 - Superfície de resposta para a isoleucina	103
Figura VI.7 – Superfície de resposta para a leucina	104
Figura VI.8 - Superfície de resposta para a fenilalanina	105

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Exemplo do teor proteico para alguns cereais, pseudocereais e leguminosas crus

.....	16
Tabela 2.2 - Matriz do planejamento 3 ²	22
Tabela 2.3 - Análise da variância	22
Tabela 3.1 - Quantidades de meio utilizadas na inoculação	31
Tabela 3.2 - Critérios de satisfação para bolores e leveduras	32
Tabela 4.1 - Teor de humidade com demolha a 20 °C e 30 °C (%).....	34
Tabela 4.2 - Teor proteico do TS maltado	35
Tabela 4.3 - Teor proteico obtido pelo método Kjeldahl e pela soma dos aminoácidos (g/100g)	37
Tabela 4.4 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para o TS cru e maltado (g/ 100g)	38
Tabela 4.5 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as diferentes demolhas (g/100g).....	38
Tabela 4.6 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as amostras demolhadas a 20°C - a azul, as melhores respostas encontradas para cada temperatura de germinação (g/ 100g)	39
Tabela 4.7 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as amostras demolhadas a 30°C - a azul, as melhores respostas encontradas para cada temperatura de germinação (g/ 100g)	40
Tabela 4.8 - Níveis dos fatores estudados	41
Tabela 4.9 - DOE aplicado no presente estudo	42
Tabela 4.10 - Resumo dos efeitos significativos para as características analisadas	44
Tabela 4.11- Identificação do melhor nível da temperatura de demolha para a proteína total ...	45
Tabela 4.12 - Melhor combinação de níveis para a proteína total	45
Tabela 4.13 - Melhor combinação de níveis para a soma dos AA.....	45
Tabela 4.14 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a His, Iso e Lis.....	46
Tabela 4.15 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a Phe e Thr	46
Tabela 4.16 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a Val e Leu.....	46
Tabela 4.17 - Melhor combinação de níveis para a His, Ile, Lys, Phe, Thr, Val e Leu	47
Tabela 4.18 - Identificação da melhor combinação de níveis para a metionina	47
Tabela 4.19 - Melhor combinação de níveis para a metionina	47
Tabela 4.20 - Resumo da melhor combinação de níveis para as características analisadas	48
Tabela 4.21 - Resumo da verificação dos pressupostos para as características analisadas.....	51
Tabela 4.22 – Quantidade de microrganismos das amostras retiradas ao longo das 72h	52
Tabela 5.1 - Temperaturas e tempo de demolha utilizados ao longo do estudo	55
Tabela 5.2 - Tempo e temperatura de secagem utilizados ao longo do estudo	56
Tabela 5.3 - Melhor combinação de níveis.....	57
Tabela IV.1- Resultados DOE proteína total	74
Tabela IV.2 - Resultados DOE histidina.....	75
Tabela IV.3 - Resultados DOE treonina	76
Tabela IV.4 - Resultados DOE lisina	77
Tabela IV.5 - Resultados DOE metionina	78
Tabela IV.6 - Resultados DOE valina	79
Tabela IV.7 - Resultados DOE isoleucina.....	80
Tabela IV.8 - Resultados DOE leucina.....	81
Tabela IV.9 - Resultados DOE fenilalanina	82
Tabela VI.1 - ANOVA para a proteína total	97
Tabela VI.2 - ANOVA condensada para a proteína total.....	97
Tabela VI.3 - ANOVA para a proteína total (demolha a 20°C)	98
Tabela VI.4 - ANOVA para a proteína total (demolha a 30°C)	98
Tabela VI.5 - ANOVA para a proteína total (enquanto soma dos AA)	98
Tabela VI.6 - ANOVA para a treonina	99
Tabela VI.7 - ANOVA condensada para a treonina.....	99
Tabela VI.8 - ANOVA para a lisina.....	100

Tabela VI.9 - ANOVA condensada para a lisina	101
Tabela VI.10 - ANOVA para a valina	101
Tabela VI.11 - ANOVA condensada para valina.....	102
Tabela VI.12 - ANOVA para a isoleucina.....	102
Tabela VI.13 - ANOVA condensada para a isoleucina	103
Tabela VI.14 - ANOVA para a leucina	103
Tabela VI.15 - ANOVA condensada para a leucina	104
Tabela VI.16 - ANOVA para a fenilalanina	105
Tabela VI.17 - ANOVA condensada para a fenilalanina.....	105
Tabela VII.1 - N° leveduras por mL ao longo da germinação	106
Tabela VII.2 - N° bolores por mL ao longo da germinação	106

Lista de abreviaturas

AA – Aminoácidos
AAE – Aminoácidos Essenciais
AACE – Aminoácidos Condicionalmente Essenciais
AANE – Aminoácidos Não Essenciais
Ala – Alanina
ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise da Variância)
AOAC – Association of Official Agricultural Chemists
Arg - Arginina
Asn – Asparagina
Asp – Ácido Aspártico
Cys – Cisteína
DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição
DC – Doença Celíaca
DOE – *Design of Experiments*
DRBC – *Dicloran Rosa Bengala Clortetraciclina*
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas)
GF – Glúten-Free
Glu – Ácido Glutâmico
Gln – Glutamina
Gly – Glicina
HC – Hidratos de Carbono
His – Histidina
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO – International Organization of Standardization (Organização Internacional de Normalização)
Iso – Isoleucina
LDL – Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
Leu – Leucina
Lys – Lisina
Met – Metionina
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
Phe – Fenilalanina
Pro – Prolina
Ser – Serina
TA – Temperatura ambiente
Thr – Treonina
Trp – Triptofano
TS – Trigo sarraceno

Tyr – Tirosina

Val – Valina

Simbologia

a – Número de níveis do fator A

d – Primeira diluição retida

F_0 – Estatística da análise de variância de um fator/ interação

g.l. – Graus de liberdade

k – Número de fatores

MS – Desvio quadrático médio de um fator n

m_0 – Massa da cápsula de metal (em gramas)

m_1 – Massa da cápsula de metal com a amostra (g)

m_2 – Massa da cápsula de metal com a amostra após atingir peso constante (g)

n – Número de réplicas

N – Número de microrganismos numa amostra

SS_A – Soma dos quadrados de um fator (ou interação)

SS_{Blocos} – Variação entre Blocos

SS_{Erro} – Variação Residual

SS_T – Variação Total

V – Volume de inóculo em cada placa, em mL

λ – O expoente apropriado a utilizar na transformação de dados para melhorar a sua normalidade

$\sum C$ – Soma de colónias presentes na placa

1. Introdução

1.1 Enquadramento e motivação

Com a crescente procura por uma alimentação mais saudável, aliada à necessidade de consumo de alimentos sem glúten por parte de doentes celíacos, alimentos funcionais como o trigo sarraceno ganharam uma maior importância, principalmente na Europa, onde a área de cultivo corresponde a 62% da área mundial (Faostat, 2018).

Além das suas propriedades nutricionais, como elevada quantidade de fibra (27,38%), alta qualidade proteica, teor de gordura (12%) (Mann, Gupta, & Gupta, 2012), vitaminas e minerais (Terpinc, Cigic, Polak, Hribar, & Pozrl, 2016), o trigo sarraceno é composto essencialmente por amido resistente, reconhecido por afetar os níveis de colesterol total, em especial da fração de baixa densidade (LDL) e de triglicerídeos (Hager, Mäkinen, & Arendt, 2014). É ainda dotado de qualidades anti-inflamatórias, anti-oxidantes e curativas em doenças crónicas (Hübner & Arendt, 2013).

Para o bom funcionamento fisiológico do ser humano, é necessária uma ingestão adequada de proteína. Os aminoácidos (constituintes da proteína) essenciais não são sintetizados pelo corpo humano, devendo por isso ser incorporados na dieta (Young & Borgonha, 2000). O trigo sarraceno, enquanto boa fonte proteica, com níveis elevados de Lisina, o aminoácido limitante nos cereais, poderá ter um papel decisivo na alimentação de quem procura ou necessita de uma dieta isenta de glúten (Wijngaard, Ulmer, & Arendt, 2006).

O processamento de alimentos é reconhecido por melhorar as características de determinados alimentos, nomeadamente a digestibilidade do amido e a qualidade proteica dos cereais/pseudocereais, no caso da maltagem (Terpinc et al., 2016).

Sabendo que o processo de maltagem está dependente de certos fatores, os quais podem ser controlados, com o objetivo de melhorar o teor proteico do trigo sarraceno, surge o interesse em aplicar desenho de experiências, em colaboração com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, de forma a determinar quais os fatores que afetam significativamente o teor proteico e o perfil em aminoácidos durante o procedimento de maltagem e quais os melhores valores de cada um desses fatores.

1.2 Objetivos

O principal objetivo da presente dissertação consistiu na melhoria do processo de maltagem das sementes de trigo sarraceno com o objetivo de melhorar o teor proteico e o perfil em aminoácidos essenciais, através da aplicação do desenho de experiências, com vista a identificar os fatores

significativos e por sua vez, a melhor combinação de níveis para cada uma das características analisadas.

Na primeira etapa e para assegurar uma absorção adequada por parte do grão, pretende-se determinar o tempo de demolha necessário a atingir uma humidade de 50% a duas temperaturas diferentes. Da mesma forma, para terminar os processos metabólicos que se dão durante a germinação, é necessário determinar o tempo de secagem necessário à obtenção de um teor de humidade abaixo dos 10%.

Para otimizar o processo de maltagem, é necessário compreender quais os parâmetros (isolados ou em interação) que influenciam o mesmo e quais os melhores níveis desses fatores. Recorre-se, assim, à aplicação do desenho de experiências (DOE) de 2 fatores a três níveis em 2 blocos, no teor proteico e conteúdo de cada aminoácido essencial.

Por fim, e de forma a validar o estudo efetuado, efetua-se um controlo da qualidade através da análise microbiológica do trigo sarraceno durante todo o processo.

1.3 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – INSA

O presente estudo foi realizado em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), onde os dados foram recolhidos e analisados. O INSA é o laboratório do sistema de saúde português, fundado em 1899 pelo médico e humanista Ricardo Jorge, que apesar de se tratar de um organismo público pertencente ao Ministério da Saúde, detém a sua própria autonomia. Além da sua principal missão, este é também o laboratório nacional de referência e o observatório nacional de saúde.

O INSA dispõe de unidades operativas em Lisboa (sede), no Porto e em Águas de Moura organizadas em seis grandes departamentos, entre os quais o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) onde o presente estudo foi realizado.

Os principais objetivos do DAN são a promoção da saúde, a prevenção de doenças de origem alimentar e a melhoria do estado nutricional da população através do estudo aprofundado da situação no país nas áreas da alimentação e nutrição humanas, tal como o próprio nome indica, em parceria com organismos nacionais e internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO).

Investigação e desenvolvimento, formação, prestação de serviços diferenciados e consultoria são algumas das diferentes atividades desenvolvidas no departamento, que também é membro de organismos nacionais como o Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Health Cluster Portugal (HCP) ou a Associação Portuguesa para a Promoção da Saúde Pública (AAPSP) e

internacionais como European Food Safety Authority (EFSA), EuroFIR (European Food Information Resource) ou International Association of National Public Health Institutes.

O DAN encontra-se ainda acreditado pelo IPAC segundo a norma ISO 17025 devido ao sistema de gestão da qualidade que se encontra implementado no departamento.

1.4 Estrutura da dissertação

A presente dissertação divide-se, estruturalmente, em 5 capítulos, que expõem ao leitor o trabalho prático elaborado.

O primeiro capítulo, no qual se encontra inserida a presente estrutura, trata-se de uma breve introdução e pretende enquadrar os temas estudados, os objetivos que se visam atingir e dar a conhecer um pouco da instituição que permitiu a realização deste estudo.

O segundo capítulo, também designado como fundamentos teóricos, expõe, com base na revisão bibliográfica, os conceitos teóricos enumerados ao longo das diferentes temáticas da dissertação, nomeadamente sobre as características, origem e tipos do trigo sarraceno; a sua importância na alimentação, enquanto alimento funcional, substituto para doentes celíacos e elevada qualidade proteica; o seu processamento, onde se descreve as diferentes fases da maltagem, o seu impacto nutricional e se referem exemplos de otimizações deste processo realizadas anteriormente; terminando com os conceitos base da análise estatística realizada.

No terceiro capítulo, apresentam-se as metodologias e materiais usados durante o processo de maltagem, análise do teor de humidade, conteúdo proteico e teor de aminoácidos e controlo de qualidade executados no INSA, assim como a análise estatística efetuada posteriormente.

O quarto capítulo consiste na discriminação dos resultados obtidos, tendo por base os métodos apresentados no capítulo anterior e respetiva análise.

No quinto e último capítulo, estão apresentadas as conclusões retiradas do estudo efetuado, assim como algumas sugestões de melhoria para estudos futuros a executar no mesmo contexto.

2. Fundamentos teóricos

2.1 Trigo sarraceno

2.1.1 Características

O trigo sarraceno (TS) é uma planta do género *Fagopyrus*, pertencente à família *Polygonaceae*, com origem na China e Ásia Central (Zhang et al., 2012). Apesar das variadas semelhanças que apresenta, inclusive a capacidade de crescer corretamente, sem recurso a fertilizantes ou pesticidas (Christa & Soral-Śmietana, 2008), o trigo sarraceno não é considerado um cereal, devido à fisiologia da sua semente sendo também caracterizado pela ausência de glúten, inserindo-se na categoria dos pseudocereais (PC) (Alvarez-Jubete, Arendt, & Gallagher, 2010).

São denominados pseudocereais todas as plantas que não pertencem à família dos cereais, legumes (*Legumisoae*), oleaginosas (com conteúdo em triciglicerol) ou frutos secos, mas que produzem frutos e sementes, ricas em amido (Fletcher, 2016), que têm como fim o consumo humano ou animal, sendo usados em farinha para pão, panquecas, *noodles*, entre outros (Campbell, 1997). Contrariamente aos cereais, que contém apenas um cotiledóne com a função de transferir os nutrientes do endosperma para o embrião, atuando, assim, como tecido absorvente durante a germinação, os PC são plantas dicotiledóneas, cujos cotiledónes, presentes no embrião, armazenam nutrientes que serão utilizados durante e após a germinação (Wijngaard, Ulmer, Neumann, & Arendt, 2005). Enquanto nos cereais, o embrião se encontra dentro do endosperma, nos pseudocereais, o tecido rico em amido dá-se pelo nome de perisperma e é este que se encontra envolvido pelo embrião, que, neste caso, tem a forma de um anel.

Devido à sua facilidade em adaptar-se aos mais variados tipos de clima, desenvolve-se em ambientes bastante diversificados, nomeadamente em solos inférteis, em que não é possível o cultivo de outras espécies, apesar do seu cultivo se dar maioritariamente no hemisfério norte (Li & Zhang, 2001). Porém, a sua raiz é curta e o peso dos seus ramos é substancialmente baixo, contribuindo para que este seja facilmente danificado por granizo, quando comparado com outras culturas de grãos, e para que este murche em climas quentes e secos.

O seu crescimento rápido pode ainda torná-lo vantajoso a nível agronómico, ajudando a quebrar ciclos de doenças, reduzir infestações de ervas daninhas e a conservar a humidade. O seu cultivo é também utilizado para prevenir a erosão do solo, aumentar a sua estabilidade e a disponibilidade dos seus nutrientes, uma vez que o resíduo do trigo sarraceno se decompõe rapidamente, libertando nutrientes para a cultura seguinte (Pavek, 2016).

Além de crescer mais rapidamente do que outras plantas, o trigo sarraceno também requer menos água e um solo com nutrientes reduzidos, crescendo mesmo em sítios com baixas temperaturas e baixas precipitações. Com folhas largas, raízes superficiais e caules eretos (Pavek, 2016), o seu cultivo é anual (Christa & Soral-Śmietana, 2008) e dá-se na estação quente. Geralmente, a flor nasce após 3-6 semanas e a maturação completa é entre as 11-12 semanas. A partir dos caules, geralmente avermelhados, desenvolvem-se vários ramos que terminam em aglomerados de pequenas flores brancas, com anteras cor de rosa (Pavek, 2016), como se observa na figura 2.1.



Figura 2.1 - Exemplo do desenvolvimento da planta de trigo sarraceno¹

¹ <https://www.hobbyfarms.com/use-buckwheat-as-a-summer-cover-crop/>

A semente, de casca triangular com um comprimento entre 4-9 mm, é o fruto da planta e é constituída pela casca, espermoderma, endosperma e embrião (Alvarez-Jubete et al., 2010). Contém apenas um único óvulo, tratando-se assim de um aquénio (Robinson, 2016), que, tal como acontece nos cereais, é constituído essencialmente por amido, que se encontra acumulado no endosperma (Wijngaard et al., 2006).

Quase todas as partes da planta podem ser utilizadas nas mais variadas aplicações. A flor é considerada uma das maiores fontes produtoras de mel, sendo a última disponível antes da chegada do inverno em diversos lugares tendo, assim, uma forte influência na agricultura, pois muitas floras necessitam de abelhas para transferir o seu pólen. Esta dura quase toda a vida do TS e é rica em flavonoides, maioritariamente rutina, atingindo até cerca de 13,8% (Li & Zhang, 2001). A semente completa é utilizada para a produção de cerveja, enquanto a casca é geralmente utilizada como enchimento para almofadas (Patricia, Phiarais, Wijngaard, Arendt, & Brew, 2005).

A semente, a principal forma de consumo humano de TS, é a matéria-prima para a produção de diversos tipos de alimento, sendo consumido, principalmente, em cereais de pequeno-almoço ou como farinha processada para utilização noutros alimentos (Giménez-Bastida & Zieliński, 2015). O alto conteúdo de amilose do pseudocereal leva a altos índices de expansão durante a cozedura por extrusão, proporcionando uma textura fina e crocante, tornando assim, os alimentos mais apelativos (Berghofer & Schoenlechner, 2007).

2.1.2 Origem e produção

Hipóteses melhor formuladas acerca da origem do TS começaram a surgir entre 1980-2000, sendo sendo a descoberta do ancestral do TS comum *F. esculentum ssp. Ancestrale*, em 1990 na província de Yunnan, na China, por Ohnishi, a grande impulsionadora deste crescente interesse (O Ohnishi, 1991). Pressupõe-se hoje que os primeiros cultivos de TS se deram no Tibete Oriental e que este era utilizado essencialmente como alimento de primeira necessidade, erva curativa ou para alimentar os animais (Mann et al., 2012). Foi depois difundido desde o sul dos Himalaias até ao Butão, Nepal, Norte da Índia e do Paquistão e mais tarde até à Coreia e Japão (Kreft, 2001).

Apesar da origem do TS remontar à Ásia Central, este foi depois difundido para a Europa por povos nómadas. No século 13, atingiu um maior relevo em países como a Alemanha, Áustria e Itália devido ao facto das suas sementes amadurecerem mais rapidamente do que outros cultivos, fornecendo uma dieta rica em hidratos de carbono (HC) (Berghofer & Schoenlechner, 2007). Além disso, o seu crescimento rápido previne o desenvolvimento de ervas daninhas e o enraizamento intensivo fortalece a estrutura do solo onde este está semeado (Amelchanka, Kreuzer, & Leiber, 2010). O alcance do continente norte americano deu-se em meados do século

17 (Alvarez-Jubete et al., 2010), através de emigrantes da Europa e da Ásia (Bonafaccia & Fabjan, 2003).

No entanto, a sua colheita produz quantidades menores comparativamente a outros grãos de cereais, o que aliado ao seu sabor peculiar, levou a uma diminuição do seu cultivo (Robinson, 2016). O cultivo de TS estende-se a muitas partes do mundo, no entanto a maior parte da sua produção concentra-se no hemisfério norte, especialmente em zonas temperadas, consistindo, por vezes, num alimento de primeira necessidade nalgumas regiões da China e nas montanhas dos Himalaias (Yan & Zongwen, 2007).

Ao longo dos últimos anos este tem vindo a tornar-se um ingrediente comum nas mais diversas cozinhas, não só porque é altamente saciante, mas também devido ao seu sabor peculiar, à variedade de pratos em que pode ser inserido e principalmente devido ao seu valor nutricional, traduzindo-se esta procura em grãos da maior qualidade possível, com um sabor mais acentuado e rico em nutrientes (Yan & Zongwen, 2007).

Em 2010, a área de cultivo mundial de trigo sarraceno era cerca de 1,9 M de hectares, um pouco menor do que os anos anteriores, possivelmente devido à crise financeira que se fazia sentir principalmente na Europa, o continente com maior cultivo do pseudocereal. Porém, esta tendência rapidamente foi invertida e em 2016, segundo dados do Faostat, este atingia uma área de cultivo de 2,4 M de hectares, predominantemente na Europa (cerca de 62%) como se observa na Figura 2.2. Entre 2010 e 2016, a taxa média anual de crescimento de área de cultivo de TS em todo o mundo foi cerca de 4%, confirmando assim o aumento da sua procura (FAOSTAT, 2018).

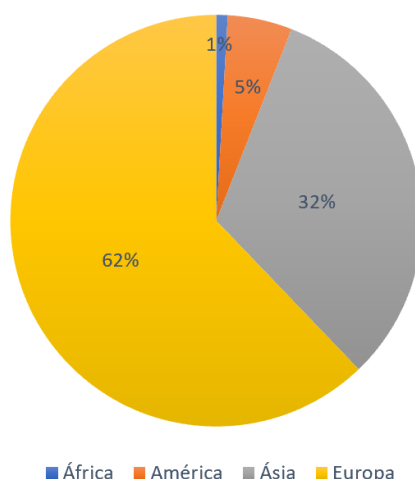


Figura 2.2 - Área de cultivo de trigo sarraceno (Faostat)

Atualmente, é um dos alimentos mais procurados por aderentes de uma dieta livre de glúten, atingindo uma produção mundial de cerca de 2,4 Mton em 2016, segundo dados do Faostat,

(FAOSTAT, 2018). Cerca de 49,5% desta produção é detida pela Federação Russa, que detém o lugar de maior produtor de trigo sarraceno.

2.1.3 Tipos de trigo sarraceno

Existem cerca de 19 espécies conhecidas pertencentes ao género *Fagopyrum*, divididas em 2 grupos: anuais e perpétuas, das quais 9 são reconhecidas como tal. Entre estas, apenas duas delas são cultivadas regularmente (Zielińska, Szawara-nowak, & Zieliński, 2010):

- *Fagopyrum Tataricum*: é conhecido como TS amargo, pois tem um sabor bastante peculiar e uma quantidade elevada de flavonoides no seu núcleo (Zhu, 2016).
- *Fagopyrum Esculentum Moench*: é mais conhecido como trigo sarraceno comum uma vez que se trata da forma mais cultivada em todo o mundo.

O cultivo de TS Tartárico dá-se maioritariamente em zonas montanhosas, como por exemplo, nos Himalaias e na China, devido à sua resistência ao gelo, curto período de crescimento, sem grande exigência de cultivo, tornando-o essencial na subsistência agrícola da zona (Zhang et al., 2012). O seu sabor amargo, o tamanho pequeno das suas sementes e a maior dificuldade em ser descascado tornam-no menos cobiçado relativamente ao TS comum. No entanto, este é bastante mais rico nutricionalmente e um potencial candidato a ser utilizado em nutrição preventiva.

O trigo sarraceno comum é a espécie mais consumida em todo o mundo, sendo inclusive cultivado na Europa, Japão e América do Norte. Apesar de ser considerado um cultivo de importância secundária relativamente a outros cereais, têm persistido ao longo dos séculos, especialmente em áreas onde é consumido localmente, como na China, Rússia, Ucrânia e Cazaquistão (Campbell, 1997). Nos últimos anos, com um crescente interesse numa dieta mais nutritiva e em cultivos alternativos, mais ecológicos/biológicos e livres de fertilizantes artificiais e pesticidas, a sua procura tem vindo a crescer gradualmente (Bonafaccia & Fabjan, 2003).

Contrariamente ao TS amargo, este tem um sabor mais doce, uma semente maior e mais facilmente descascável. No entanto, também apresenta um teor de rutina (Jiang et al., 2007) e flavonóides menos significativo (Christa & Soral-Śmietana, 2008).

Apesar de muito menos frequente, mas ainda com alguma significância principalmente na Ásia, existe também o trigo sarraceno Dourado ou Alto, do género *Cymosum* (Zhu, 2016). Este é bastante semelhante morfológicamente ao TS comum (Ohmi Ohnishi, 1980).

2.1.4 Trigo sarraceno na Europa

Na Europa, assim como no resto do mundo, o cultivo de TS tem vindo a crescer nos últimos tempos, a par da procura por uma alimentação mais saudável, livre de glúten e rica em alimentos biológicos. Este voltou a ser cultivado na Hungria e República Checa. Na Eslovénia, onde uma atitude mais “verde” está bem difundida, o TS comum cresce em todo o país, existindo até por vezes 2 colheitas no mesmo, assim como no sul da Áustria (Kreft, 2001). Também na região alpina de Itália, tem existido um maior desenvolvimento, onde este é utilizado na preparação de pratos típicos da região.

O seu consumo é maioritariamente sob a forma de farinha na Europa Central e Oriental, em massas, no sudeste de França, norte de Itália e Eslovénia e em pão de mistura, em conjunto com outros tipos de farinha, na Áustria, Eslovénia e República Checa (Bonafaccia & Fabjan, 2003).

Em alguns países da Europa Central e Oriental, é ainda utilizado em dietas para diabéticos e na prevenção do cancro do colo do útero, sob a forma de grânulos, que se obtêm por descongelação do grão pré-cozido descascado (Bonafaccia & Fabjan, 2003).

O TS Tartárico crescia tradicionalmente, em pequenas quantidades, em alguns países da Europa Central, especialmente na região Alpina. Por volta de 1980, este cultivo cessou, crescendo apenas na fronteira entre o Luxemburgo, Alemanha e Bélgica em cerca de 50 ha. Na Eslovénia, este foi trocado pelo TS comum e é apenas encontrado como erva no cultivo do mesmo (Bonafaccia & Fabjan, 2003).

2.2 Importância do trigo sarraceno na alimentação

2.2.1 Alimentos funcionais

O número de pessoas com deficiências alimentares, que se reflete maioritariamente na maior incidência de doenças como obesidade, diabetes, hipertensão, acidentes vasculares cerebrais, entre outros, sofreu um aumento nas últimas décadas, desenvolvido em grande parte devido à globalização e desenvolvimento económico, que proporcionaram uma facilidade no acesso a um tipo de produtos menos saudável. Porém, também a consciencialização e interesse num estilo de vida mais saudável relativamente a alimentos que podem vir a melhorar a sua qualidade de vida tem vindo a aumentar (Jnawali, Kumar, & Tanwar, 2016).

De uma forma geral, todos os alimentos contêm valor nutricional e, portanto, são fundamentais para a sobrevivência humana. No entanto, existem ainda alguns aos quais são reconhecidos cientificamente benefícios adicionais para a saúde humana, além dos requisitos nutricionais

básicos, aos quais se dá o nome de funcionais (Pang, Xie, Chen, & Hu, 2012). Estes podem apresentar-se sob a forma de sumos, leites, iogurtes, cereais, entre outros (González-Sarriás, Larrosa, García-Conesa, Tomás-Barberán, & Espín, 2013).

Apesar de o maior interesse por alimentos funcionais ter surgido apenas nos últimos anos, nalgumas culturas orientais como China, Japão e até na Polónia, onde os alimentos são vistos não apenas como comida essencial, mas também como um meio de garantir uma alimentação equilibrada (Pang et al., 2012), o TS já era conhecido como alimento funcional há algumas décadas, sendo utilizado como substituto de arroz ou batatas (Dietrych-Szostak & Oleszek, 1999).

Este pseudocereal é reconhecido essencialmente pelo seu amido resistente, que pode afetar o nível de colesterol total (Mann et al., 2012), e de triacilgliceróis de forma similar à de polissacarídeos solúveis não amiláceos (Kreft, 2001), pelas suas proteínas de alto valor biológico, mas de baixa digestibilidade, pela ausência de glúten, sendo, portanto, segura a sua ingestão por doentes celíacos (Bonafaccia & Fabjan, 2003) e pela elevada quantidade de *Fagopyritols*.

A suscetibilidade a enzimas e a digestão do amido são mais baixas, devido à presença de taninas, ácido fítico e inibidores de protease, o que proporciona efeitos benéficos a este pseudocereal, incluindo atividade mais baixa do colesterol, reduzida acumulação da gordura corporal, anti-hipertensivo (Campbell, 1997), anti-inflamatório e pode ajudar a prevenir o cancro do colón (Zhu, 2016).

Fagopyritols são compostos que se acumulam nas sementes de alguns cereais, essencialmente nos tecidos do embrião e dos aleurones, com estrutura bastante semelhante à *Galactosamine D-chiro-inositol*, um composto reconhecido como mediador de insulina de baixo pH (Steadman et al., 2000). O seu consumo em particular, através do consumo de TS, tem demonstrado efeitos hipoglicémicos em diabéticos, que podem ser bastante úteis especialmente no tratamento da diabetes II (Wijngaard et al., 2006).

O trigo sarraceno, além de uma boa fonte de nutrientes, é não só reconhecido pela sua alta qualidade proteica, quantidade elevada de fibra (cerca de 27,38% nas suas sementes), que pode ajudar a evitar obstipações (Mann et al., 2012), ácidos gordos essenciais polinsaturados (com um teor de gordura de cerca de 12%), vitaminas, amido resistente e minerais (Terpinc et al., 2016), mas também devido aos efeitos positivos dos seus compostos fenólicos e esteróis, o que tem proporcionado uma maior atenção por parte dos cientistas (Giménez-Bastida & Zieliński, 2015), como efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e eficazes na prevenção do cancro (Hübner & Arendt, 2013).

É, assim, também um alimento preventivo, devido ao seu potencial curativo em doenças crónicas, como diabetes e arteriosclerose, e ao facto de prevenir danos na cadeia do DNA (Hager

et al., 2014), tornando-o num dos alimentos com maior procura por quem deseja um estilo de vida mais saudável. Conhecido como erva medicinal, na China, o TS apresenta-se eficaz como anti-inflamatório e na prevenção contra o cancro. Estudos afirmam, ainda, que TS pode matar bactérias do intestino, ajustar e remover coagulação no sistema digestivo e ajudar a libertar a febre (Li & Zhang, 2001).

Os flavonoides tratam-se de um dos compostos nos quais os polifenóis se dividem e representam um papel importante na proteção da planta contra a radiação UV, agentes patogénicos e herbívoros e ajudam a manter a integridade da estrutura da parede da célula. Estes proporcionam efeitos benéficos ao TS através da sua elevada atividade anti-oxidante (Guo et al., 2011) (Giménez-Bastida, Piskula, & Zieliński, 2015) e anti-inflamatória, eficaz na cura do estômago. São ainda utilizados para tratar doentes com hemorragias cerebral, pulmonar e ceratite cerebral e do estômago (Li & Zhang, 2001).

Estudos anteriores afirmam que o seu efeito anti-oxidante é proporcionado essencialmente pelo conteúdo de rutina (quercetin-3-rutinoside) presente no mesmo, sendo este dependente do tipo de TS e das suas condições de crescimento e pelo elevado teor de epicatequina (um tipo de flavonóide anti-oxidante) nas suas flores e folhas (Giménez-Bastida, Piskula, et al., 2015).

A rutina é encontrada nas mais diversas plantas, frutas e vegetais, apesar do trigo sarraceno ser a maior fonte deste composto e o único pseudocereal que a contém na sua composição (Zhang et al., 2012). A sua função primária é fortalecer as artérias e as veias, assim como os ossos e os dentes. Estudos demonstram que este flavonoide é anti-cancerígeno, ajuda a parar edemas venosos, é a reduzir a agregação de plaquetas e, por sua vez, a espessura do sangue, melhorando a circulação sanguínea, sendo bastante utilizada na prevenção de doenças cardiovasculares (Campbell, 1997). É dotada de efeitos preventivos e curativos, existindo indicações de que pode prevenir ou atrasar o desenvolvimento de diabetes.

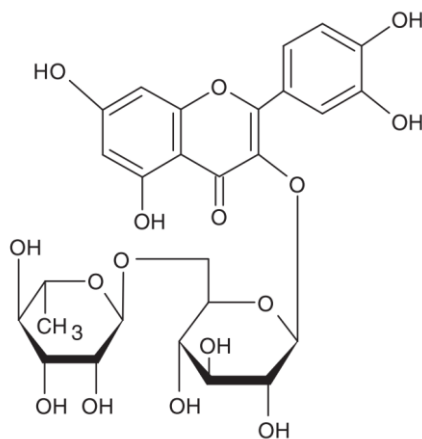


Figura 2.3 - Estrutura da Rutina (Vachirapatama, Chamnankid, & Kachonpadungkitti, 2011)

Aliadas a todas estas propriedades, a rutina é ainda dotada de propriedades anti-oxidantes, prevenindo a oxidação da vitamina C e reduzindo a cito-toxicidade do colesterol LDL oxidado, diminuindo, assim, o risco de doença cardíaca (Vachirapatama et al., 2011). No entanto, recentemente, Zielińska et al. analisou a contribuição da rutina para a atividade anti-oxidante do TS em espécies com diferentes origens, de onde concluiu que a contribuição da mesma é baixa e que o seu foco como o maior anti-oxidante pode estar a ser sobrestimado.

2.2.2 Importância na doença celíaca

Segundo a Associação Portuguesa de Celíacos (APC), a doença celíaca (DC) trata-se de uma reação imunológica do organismo contra o próprio intestino delgado, que ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis aquando da ingestão de glúten, mesmo que em pequenas quantidades, causando danos severos na mucosa do mesmo, comprometendo a sua funcionalidade, nomeadamente a sua capacidade de absorção (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Apesar das suspeitas de que esta seria uma patologia rara, atualmente, esta é a doença alimentar mais comum em humanos e o seu diagnóstico continua a crescer, mesmo em partes do mundo onde se suspeitava que não existisse (Mejías et al., 2014). Este crescimento deve-se em grande parte à melhoria de processos de diagnóstico, como a serologia e biópsia, que indicam uma prevalência entre 0,33-1,06% em crianças e entre 0,18-1,2% em adultos (Saturni, Ferretti, & Bacchetti, 2010).

Ao grupo de proteínas de armazenamento que se encontram no endosperma rico em amido dos grãos de cereais do tipo *Triticeae* (Tatham & Shewry, 2012), que incluem o trigo (gliadina), a cevada (hordeína) e o centeio (secalina), dotadas de propriedades bioquímicas que permitem a formação da massa viscoelástica dos polipéptidos, dá-se o nome de glúten (Malalgoda & Simsek, 2017). Estas proteínas provocam inflamação no intestino e atrofia das vilosidades, o que se traduz numa diminuição da área de superfície do mesmo órgão (Mejías et al., 2014), redução das enzimas digestivas e má absorção de micronutrientes como vitaminas e ácido fólico (Rubio-Tapia, Hill, Kelly, Calderwood, & Murray, 2013), provocando sintomas no paciente, como dor abdominal, diarreia, gases, fadiga, perda de peso e anemia, sendo estes os sintomas mais comuns da doença (Chand & Mihas, 2006).

Até ao momento, o único tratamento para a DC é uma dieta livre de glúten para o resto da vida, onde alimentos como pão, massas, farinha entre outras importantes fontes de energia são completamente excluídos, permitindo a recuperação do intestino e reduzindo o risco de outras complicações relacionadas com a doença (Jnawali et al., 2016). Este não é um estilo de vida fácil de adotar, pois o trigo é um dos alimentos mais consumidos a nível mundial (Mejías et al., 2014), sendo, então, necessária uma vigilância constante, que pode ser acompanhada de um

sentimento de isolamento social e da pressão para evitar o consumo de todos os alimentos que contém glúten na sua composição (See & Murray, 2006).

Além da preocupação com o bem-estar psicológico, é também necessário fazer as devidas substituições alimentares, de modo a evitar défices nutricionais (Kinsey, Burden, & Bannerman, 2008), com uma maior ingestão de um macronutriente em detrimento dos restantes (Alvarez-Jubete et al., 2010). De forma a evitar este desequilíbrio nutricional, a procura e, por sua vez, o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis para doentes celíacos tem crescido largamente nos últimos anos (Jnawali et al., 2016).

Estudos realizados nos últimos anos demonstram deficiências nutricionais em cerca de 20-38% em pacientes com uma dieta restrita ao glúten (Giménez-Bastida, Piskula, & Zieliński, 2015), com uma ingestão insuficiente de proteínas e demasiado alta de lípidos, nomeadamente gorduras saturadas, quando comparado com indivíduos com uma alimentação normal. (Jnawali et al., 2016) Também um deficiente consumo de fibra tem sido diagnosticado durante uma dieta GF, que pode estar relacionado com a baixa qualidade destes alimentos, com as escolhas alimentares do doente ou com o baixo consumo de alimentos naturalmente ricos em fibra. No entanto, é de conhecimento geral que para prevenir doenças como cancro do cólon, diabetes ou doenças cardiovasculares, é essencial uma ingestão adequada de fibra (Vici, Belli, Biondi, & Polzonetti, 2016).

Comparativamente a outros cereais, frutas e frutos secos, os pseudocereais revelam-se boas fontes de fibra, com teores entre 7-10 g/100g (Vici et al., 2016), solúveis e insolúveis, que possuem um efeito bastante positivo na prevenção de obstipações e situações de obesidade (Patricia et al., 2005). Com o incremento da palatabilidade de alimentos feitos a partir de PC, a produção de alimentos saudáveis e glúten-free a partir especialmente de trigo sarraceno, nomeadamente em cereais de pequeno-almoço, tem vindo a crescer ao longo dos últimos anos tornando-o uma valiosa fonte proteica, de qualidade semelhante à proteína animal (Alvarez-Jubete et al., 2010), com elevado conteúdo de aminoácidos essenciais (Christa & Soral-Śmietana, 2008), sendo recomendado pela *World Gastroenterology Organization* para pacientes com CD (Mota et al., 2016).

Vinagre, cerveja, pão, papas, *noodles*, massas e bolachas são alguns dos produtos à base de trigo sarraceno que têm sido desenvolvidos recentemente, no entanto, a maior parte destes produtos ainda não se encontra disponível em grandes centros de distribuição (Zhu, 2016), demonstrando que é cada vez mais importante ter várias considerações em conta durante o design deste tipo de produtos, como procura atual, custo, aceitabilidade e até mesmo a faixa etária a que são destinados (Jnawali et al., 2016).

Hübner & Arendt, em 2013, concluíram que, apesar de alguns componentes benéficos poderem ser degradados durante o procedimento, os processos de germinação e maltagem aumentam a digestibilidade dos cereais (Alvarez-Jubete et al., 2010), proporcionando uma forte influência

positiva na qualidade nutricional dos grãos dos mesmos, desde que adaptados ao tipo de grão, podendo ser uma ferramenta-chave na melhoria das características dos pseudocereais, como o trigo sarraceno.

2.2.3 Conteúdo proteico e estrutura de aminoácidos

As proteínas são, quimicamente, reconhecidas como polímeros naturais de aminoácidos, que se mantêm ligados por ligações peptídicas, que têm na sua constituição hidrogénio, oxigénio, azoto, enxofre, carbono, etc, tratando-se, assim, de compostos orgânicos complexos (Mota, 2015). Este macronutriente é o maior fornecedor de nitrogénio na dieta humana e tem um papel essencial nos componentes funcionais e estruturais dos sistemas biológicos (Boye, Wijesinha-Bettoni, & Burlingame, 2012).

Os aminoácidos (AA), que se distribuem pelas células do organismo, são o resultado da hidrolisação das proteínas durante a digestão (Mota et al., 2016) e ajudam na construção de todos os órgãos vitais, músculos (incluindo os do coração), hormonas e fluidos biológicos, como o sangue (Boye et al., 2012). Estes podem ser classificados em 3 categorias diferentes:

- Essenciais (AAE): Aos aminoácidos que não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, por sua vez, devem ser ingeridos na dieta, dá-se o nome de essenciais (AAE) e são estes a histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val). São estes a parte mais importante da proteína, uma vez que são essenciais para o crescimento e manutenção das necessidades metabólicas (Young & Borgonha, 2000);
- Não essenciais (AANE): Aqueles que o organismo necessita, mas consegue produzir – alanina (Ala), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln) e serina (Ser) (Young & Borgonha, 2000);
- Condicionalmente Essenciais (AACE): Aqueles que geralmente não são essenciais, mas que podem vir a ser em certas condições patológicas ou fisiológicas, em que o corpo não os consegue sintetizar em quantidades adequadas. São eles a cisteína (Cys), tirosina (Tyr), glicina (Gly), arginina (Arg) e prolina (Pro) (Boye et al., 2012).

Um exemplo a considerar no caso dos AACE, é o caso da Cys e da Tyr, que apesar de essenciais para o funcionamento do organismo, não são considerados AAE, pois podem ser sintetizados a partir da metionina e da fenilalanina, respetivamente (Mota, 2015).

É necessário um constante fornecimento de proteína de boa qualidade para manter as funções fisiológicas a funcionar corretamente, uma vez que o corpo humano é incapaz de manter reservas proteicas e uma ingestão inadequada da mesma pode afetar todos os órgãos do corpo humano, incluindo órgãos vitais, como o cérebro, o coração, sistema imunitário, entre outros. Assim, a qualidade proteica na alimentação é um critério bastante importante para uma nutrição adequada e uma vida mais saudável (Boye et al., 2012).

O teor proteico nos pseudocereais, assim como a sua qualidade proteica, é mais equilibrado e rico do que noutros cereais. Particularmente, a lisina, o aminoácido limitante nos cereais, encontra-se em quantidades bastante elevadas (Wijngaard et al., 2006), assim como a arginina, conferindo um alto valor biológico à proteína de TS (Giménez-Bastida, Piskula, et al., 2015). O TS pode ser, assim, um bom complemento para outras plantas, com um teor de Lisina mais baixo. O rácio Lys/Arg e Met/Gly na proteína de TS também são mais baixos do que os que se encontram noutras plantas, o que significa que esta deve potencialmente reduzir o colesterol. (Li & Zhang, 2001).

Observa-se na Tabela 2.1, que apesar do TS apresentar um teor proteico ainda inferior ao da maioria das leguminosas, este é semelhante ao dos restantes pseudocereais e superior ao do trigo, arroz, milho ou millet.

Tabela 2.1 - Exemplo do teor proteico para alguns cereais, pseudocereais e leguminosas crus²

Cereais		Proteína (g/100g)
Cereais	Arroz	7,7
	Milho	8.8
	Proso	11.58
	Millet	
	Trigo	10,5
Pseudo cereais	Trigo	13,1
	sarraceno	
	Amaranto	13,5
	Quinoa	14,2
Legumes	Grão	23,6
	Lentilhas	22,7
	Grão de soja	36,1
	Ervilha	21,3

² (Mota et al., 2016)(Jnawali et al., 2016)

Aliado a este facto, também a biodisponibilidade, próxima da que se encontra na proteína animal (Alvarez-Jubete et al., 2010), e a digestibilidade da proteína, indicadores da qualidade da proteína, se revelam elevados quando comparados com os cereais (Robinson, 2016). A quantidade de prolaminas, proteínas de armazenamento que se encontram em grandes quantidades na maioria dos cereais e que são tóxicas para celíacos, é relativamente baixa ou inexistente (Alvarez-Jubete et al., 2010) (Gorinstein et al., 2002).

Estudos indicam ainda que a proteína de TS é benéfica para a saúde nas mais variadas formas, pois reduz o colesterol no sangue, como já foi mencionado, reduz a formação de pedras na vesícula (Tomotake et al., 2000), ajuda na cura de doenças crónicas, inibe o cancro da mama causado pelo 7,12-dimetilbenzeno e ainda se demonstra eficaz na prevenção da obesidade (Zhang et al., 2012).

2.3 Processamento do trigo sarraceno

2.3.1 Maltagem

É de conhecimento comum que os grãos de cereais são germinados há milhares de anos, essencialmente para melhorar as suas propriedades nutricionais, mas também porque durante o processo, a sua cor e sabor são alterados. Quando esta germinação se dá de forma controlada e termina com um tratamento de calor, diz-se que as sementes estão maltadas (Mäkinen, Zannini, & Arendt, 2013).

A maltagem é uma das mais promissoras formas de processamento atualmente. O seu principal objetivo é produzir enzimas e quebrar as barreiras das células que se encontram ao redor dos grânulos de amido, degradando a matriz proteica e convertendo-a em péptidos solúveis e aminoácidos para fornecer substrato para a síntese proteica no embrião em crescimento (Klose, Schehl, & Arendt, 2009).

O procedimento consiste, então, em três fases distintas:

- Demolha – Para garantir a adsorção adequada de água pelo grão;
- Germinação – Onde se dá o crescimento do embrião, a síntese enzimática e a repartição limitada do endosperma;
- Secagem – Assegurar a estabilidade do produto.

A demolha é o processo de preparação da germinação e consiste, como o próprio nome indica, na demolha dos grãos em água, de modo a aumentar o teor de humidade no seu núcleo até cerca de 43-45% (Kaukovirta-Norja, Wilhelmson, & Poutanen, 2004). É importante atingir este

valor, pois tem um grande impacto nos processos metabólicos que se dão durante a etapa seguinte (Hübner & Arendt, 2013).

A fase de germinação ocorre sob parâmetros estritamente controlados, temperatura e humidade, e pode ser considerada como pré-tratamento do cereal cru, com o objetivo de modificar a estrutura e composição do núcleo para facilitar um posterior processamento do mesmo em processos de fracionamento ou extração (Kaukovirta-Norja et al., 2004).

A secagem tem como principal objetivo a secagem do grão até este atingir um teor de humidade entre 5-10% (Patricia et al., 2005), com o objetivo de parar os processos metabólicos, dando-se por terminada a germinação. Esta fase pode ser dividida em três diferentes: *Free Water*, onde a humidade decresce desde cerca de 50% para 20%; *Intermediate*: entre os 20-10%; *Bound Drying*, onde se atinge um valor entre 5-8% (Phiarais et al., 2006), como se pode observar na Figura 2.4. Desta forma, garante-se a estabilidade microbiológica do produto e evita-se que as reações bioquímicas continuem a ocorrer. Simultaneamente, formam-se produtos de *Maillard*, providenciando aroma e sabor ao grão (Mäkinen et al., 2013).

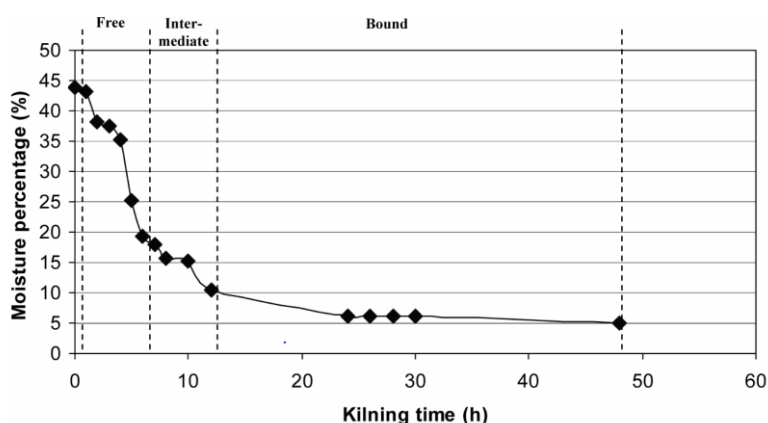


Figura 2.4 - Diferentes fases da secagem (Patricia et al., 2005)

2.3.2 Impacto nutricional da maltagem

O processo de maltagem é essencial para melhorar a qualidade proteica dos alimentos, a digestibilidade do amido. O malte é ainda reconhecido pelo seu elevado teor de pré-bióticos, conduzindo à redução dos sintomas e melhoria na inflamação da mucosa intestinal em pacientes com doenças intestinais crónicas (Terpinc et al., 2016).

Durante a fase de germinação, enzimas são sintetizadas ou ativadas de modo a mobilizar os compostos de armazenamento do grão, aumentando, assim, a atividade enzimática e influenciando a biodisponibilidade de componentes funcionais e a absorção de nutrientes

(Mäkinen et al., 2013). O teor de vitamina C aumenta substancialmente, assim como o de ferro, zinco e cálcio, nutrientes vitais, especialmente em crianças e idosos, que por vezes não os ingerem nas quantidades adequadas, devido à baixa eficiência do seu estômago, existindo a necessidade de integrar (pseudo)cereais maltados na sua dieta (Platel, Eipeson, & Srinivasan, 2010). Também o conteúdo proteico cresce em determinadas condições de germinação (Paucar-Menacho, Peñas, Dueñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2017).

A α -amilase, trata-se de um exemplo de enzimas presentes nos cereais, cuja atividade aumenta bastante durante a mesma fase, levando à hidrólise de amilase e amilopectina em dextrinas e maltose, reduzindo a viscosidade de produtos maltados e aumentando simultaneamente a sua energia e densidade de nutrientes (Hotz & Gibson, 2018), tornando estes alimentos benéficos como complemento na dieta de crianças em fase de desmame e crescimento (Platel et al., 2010).

O processo de maltagem proporciona, ainda, um aumento na digestibilidade da proteína, relativamente ao produto cru, apresentando resultados bastante elevados, quando comparado com o procedimento de torra do grão (Gahlawat & Sehgal, 1994), sendo por isso uma alternativa a considerar na dieta de pessoas de 3ª idade, uma vez que, nesta faixa etária, surgem problemas na digestão dos alimentos (Platel et al., 2010). Durante o processo, dá-se também um incremento no teor de folatos, micronutrientes essenciais para um crescimento e desenvolvimento correto, cuja ingestão deficiente pode ser associada a doenças metabólicas e condições fisiopatológicas (Motta et al., 2017) e por outro lado, uma diminuição do teor de antinutrientes, como fitatos (Hotz & Gibson, 2018).

2.3.3 Otimização das condições de maltagem

Ao longo dos últimos anos, têm surgido diversos estudos com o objetivo de otimizar as condições de germinação/maltagem para ambos os consumos já referidos.

Em 2007, Zarnkow et al., (2007) recorreram à metodologia de superfície de resposta (MSR) para investigar a influência do tempo e temperatura de germinação em parâmetros como temperatura de gelatinização, atividade da α -amilase, viscosidade e cor do *Millet Proso*, obtendo os melhores resultados aos 5 dias de germinação com uma temperatura de demolha e germinação de 22 °C.

Também Paucar-Menacho et al., (2017) utilizaram a MSR para otimizar o tempo e temperatura de germinação de um tipo de Amarantho, com o intuito de melhorar a acumulação de compostos bioativos e a atividade antioxidante do mesmo, com melhores resultados para uma temperatura de germinação de 26 °C durante 63 h.

Khattak et al. (2006), verificaram a influência de parâmetros como o tempo de germinação e iluminação no teor de polifenóis e de ácido fítico durante a germinação de rebentos de grão, com recurso a análise estatística, utilizando a análise da variância, obtendo melhores resultados para

um tempo de germinação de 24 h e iluminação de cor azul e Klose et al. (2008), analisaram o perfil proteico da aveia e como este se modificava ao longo do procedimento de maltagem.

Estes estudos estendem-se ainda ao trigo sarraceno, onde Wijngaard, et al. (2005) analisaram o efeito do tempo de demolha, da temperatura e do tempo de germinação com foco nos parâmetros com os quais se avalia a qualidade do malte para preparação de cerveja. Concluíram que o melhor tempo de demolha é aquele no qual se atinge um teor de humidade entre 35 e 40%, a temperatura ideal de germinação se situará entre 16.5 e 20.2 °C e que para uma temperatura de germinação de 15 °C, será ideal deixar o grão germinar entre 4 a 5 dias.

Apesar dos primeiros estudos relativamente ao procedimento de maltagem serem relativos à utilização dos cereais para fabricação de cerveja, nos últimos anos esta tendência tem-se alterado, sendo o maior foco o consumo após maltagem, devido à sua riqueza nutricional. Terpin et al., (2016), investigaram também o impacto da maltagem no perfil de compostos fenólicos e nas propriedades antioxidantes do mesmo a diversas temperaturas de germinação e de secagem com maior incremento destas propriedades a um tempo de germinação de 88 h e temperatura de secagem de 60 °C. Foi ainda analisado o efeito deste procedimento no teor de folatos comparativamente com outras formas de processar os alimentos (Motta et al., 2017), onde se concluiu que a maltagem proporcionava melhores resultados do que os restantes métodos de cozedura.

É, assim, importante investigar o efeito da temperatura de demolha e do tempo e temperatura de germinação no teor proteico deste pseudocereal nutricionalmente rico, verificando se a influência destes se dá de forma interativa ou isoladamente.

2.4 Análise Estatística

2.4.1 Desenho de experiências

Como já foi referido anteriormente, o processo de maltagem encontra-se dividido em diversas fases, as quais estão dependentes de vários fatores que podem ser controlados durante o procedimento, de forma a melhorar uma certa característica da qualidade. De forma a determinar quais afetam certas características e quais os melhores valores desses fatores, para que o procedimento possa ser otimizado, pode recorrer-se ao desenho de experiências (DOE), uma vez que este considera não só os efeitos isoladamente, mas também as suas interações.

Para que o DOE se execute de forma correta e produza resultados positivos, deve ser *a priori* realizada uma abordagem sistemática:

1. Definir claramente os objetivos das experiências;
2. Analisar antecedentes relevantes;

3. Selecionar/escolher as características da qualidade;
4. Selecionar os fatores a experimentar e respetivos níveis;
5. Analisar previamente as possíveis interações entre fatores;
6. Identificar os fatores que permanecerão constantes ao longo do processo;
7. Identificar restrições à experimentação;
8. Definir o número de experiências a executar e planejar, utilizando a matriz mais adequada;
9. Definir o número de réplicas;
10. Executar as experiências de forma aleatória (Pereira, & Requeijo, 2012).

Após a realização das experiências, recorre-se à análise da variância para o tratamento estatístico dos resultados obtidos, que permite identificar, de forma objetiva, quais os fatores e/ou interações que afetam significativamente as respostas e, por sua vez, a combinação de níveis que maximiza os resultados obtidos. Na presente dissertação, será apenas objeto de estudo o desenho fatorial 3^k com blocos.

2.4.1.1 Desenho com fatores a três níveis

Num fatorial completo 3^k , todos os fatores têm três níveis e todas as combinações possíveis são experimentadas. Com este fatorial, é possível modelar uma relação quadrática entre a resposta e os níveis dos fatores, para ajustar um modelo de 2ª ordem.

Seguidamente é apresentado um fatorial 3^2 , com 2 fatores a 3 níveis. Os níveis dos fatores são designados por -1, 0, 1 que correspondem ao nível baixo, intermédio e alto, respetivamente. Cada combinação de níveis é representada por k dígitos, onde o primeiro indica o nível do primeiro fator (A) e o segundo o do segundo fator considerado (B), sendo cada nível combinado sucessivamente com cada conjunto de níveis acima dele, como se pode observar na Tabela 2.2 (Pereira, Requeijo, 2012). A e B correspondem, neste estudo, à Temperatura e Tempo de Germinação, respetivamente.

A matriz do planeamento 3^2 , construída pela ordem padrão, à qual corresponde um total de 9 experiências a realizar encontra-se na Tabela 2.2.

Na presente dissertação, consideraram-se dois blocos (duas temperaturas de demolha diferentes) e, por isso, a matriz anterior foi construída duas vezes.

Tabela 2.2 - Matriz do planejamento 3^2

Combinação		A	B
-1	-1	-1	-1
0	-1	0	-1
+1	-1	+1	-1
-1	0	-1	0
0	0	0	0
+1	0	+1	0
-1	+1	-1	+1
0	+1	0	+1
+1	+1	+1	+1

2.4.2 Análise da variância

Num fatorial 3^k , cada efeito principal pode ser decomposto em duas componentes: Linear e Quadrática, correspondendo cada uma a um grau de liberdade. Deste modo, cada interação de dois fatores pode ser decomposta em quatro componentes diferentes: Linear x Linear ($AB_{L \times L}$), Linear x Quadrática ($AB_{L \times Q}$), Quadrática x Linear ($AB_{Q \times L}$) e Quadrática x Quadrática ($AB_{Q \times Q}$), cada uma com um grau de liberdade. Durante a análise da variância, serão estas as componentes que serão analisadas.

A Tabela ANOVA a ser construída para o caso mais simples, considerando dois blocos, encontra-se a baixo:

Tabela 2.3 - Análise da variância

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F ₀
A	SS _A	2	SS _A /2	MS _A /MS _{erro}
B	SS _B	2	SS _B /2	MS _B /MS _{erro}
AB	SS _{AB}	4	SS _{AB} /4	MS _{AB} /MS _{erro}
Blocos	SS _{Blocos}	1	SS _{Blocos} /1	MS _{Blocos} /MS _{erro}
Erro	SS _{erro}	8	SS _{erro} /6	
Total	SS _T	17		

Geralmente, inicia-se a construção da tabela pelo cálculo da variação total, Equação 1:

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{(Y \dots)^2}{abn} \quad (2.1)$$

Com $(abn-1)$ graus de liberdade.

Onde:

- y diz respeito à observação para a combinação do nível i do fator A com o nível j do fator B na réplica k ($i=1,2,\dots,a$; $j=1,2,\dots,b$; $k=1,2,\dots,n$);
- $Y \dots = N = a \times b \times n$

De seguida calcula-se as variações dos fatores e interações:

$$SS_A = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i..}^2}{bn} - \frac{(Y \dots)^2}{abn} \quad (2.2)$$

Com (a-1) graus de liberdade.

$$SS_B = \sum_{j=1}^b \frac{Y_{.j.}^2}{an} - \frac{(Y \dots)^2}{abn} \quad (2.3)$$

Com (b-1) graus de liberdade

$$SS_{AB} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{Y_{ij.}^2}{n} - \frac{(Y \dots)^2}{abn} - SS_A - SS_B \quad (2.4)$$

Com (a-1)(b-1) graus de liberdade.

Para calcular a variação entre blocos, considera-se a seguinte expressão:

$$SS_{Blocos} = \frac{(\sum y)_{Bloco\ 1}^2 + (\sum y)_{Bloco\ 2}^2}{n^{\circ} \text{ de observações em cada bloco}} - \text{Fator de correção} \quad (2.5)$$

Com (nº blocos -1) graus de liberdade.

Sendo:

$$(\sum y)_{Bloco\ i} = \text{soma dos valores da resposta do } Y \text{ das experiências do bloco } i \quad (2.6)$$

Por fim, calcula-se a variação do erro, como a diferença entre a variação total e a soma das restantes (Pereira, Requeijo, 2012):

$$SS_{erro} = SS_T - SS_A - SS_B - SS_{AB} - SS_{Blocos} \quad (2.7)$$

2.4.3 Verificação dos pressupostos da análise da variância

De forma a validar o estudo realizado (DOE), é necessário ainda verificar se os pressupostos da análise da variância se verificam, mais concretamente, se os erros são constantes e normalmente distribuídos com média nula e variância constante.

Esta análise deve, então, incluir os seguintes aspetos:

- Verificação da normalidade: é construído o gráfico da distribuição normal e verifica-se se os resíduos se dispõem aproximadamente em linha reta. Se isto acontecer, diz-se que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito.
- Resíduos e ordem das experiências: a independência é avaliada através da construção de um gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória pela qual as experiências foram efetuadas. Para que este pressuposto seja satisfeito, o gráfico não deverá apresentar nenhuma tendência especial, estando os resíduos dispostos de forma aleatória. No presente estudo, este pressuposto não será alvo de avaliação, uma vez que não foi possível executar as experiências de forma aleatória, tendo em conta o procedimento realizado.
- Resíduos em função dos valores previstos ou estimados: é através de um gráfico dos resíduos em função dos valores previstos que se verifica se a variância é constante. Caso o gráfico não apresente nenhuma estrutura especial, nomeadamente em forma de funil, considera-se que o pressuposto não foi violado.

3. Metodologia, materiais e métodos

Neste capítulo serão apresentados todos os materiais e métodos utilizados no decurso da maltagem do trigo sarraceno, análise proteica e posterior análise estatística dos dados obtidos.

A primeira fase do processo consistiu na maltagem do TS, de agricultura biológica, provenientes de estabelecimentos comerciais na grande Lisboa, Nas sementes, antes e após a germinação, procedeu-se à análise do teor de proteína total e quantificação dos aminoácidos. Simultaneamente, foi realizado um controlo de qualidade que consistiu numa análise microbiológica após a demolha e a cada 24 h, após o início da germinação.

3.1 Maltagem

O processo de maltagem, tal como se refere na revisão da literatura, pode ser dividido em três fases distintas, com diferentes parâmetros ajustados ao propósito de cada uma delas.

3.1.1 Demolha

Tendo como objetivo a aplicação do seguinte método em qualquer tipo de ambiente, consideraram-se duas temperaturas de demolha correspondentes a uma temperatura média em Portugal (20 °C) e a uma temperatura alta (30 °C), bastante comum nos meses de verão.

Para a determinação do tempo necessário para a demolha de trigo sarraceno, colocaram-se cerca de 10 g de TS em placas de petri a 20 °C (Terpinc et al., 2016) e a 30 °C (Motta et al., 2017) , preenchidas com água numa razão de 1/10, com o objetivo de se atingir uma humidade acima de 45% (Kaukovirta-Norja et al., 2004) (Wijngaard et al., 2005), (Mäkinen et al., 2013), relativamente ao seu peso inicial, como demonstrado na figura 3.1. Na sementes hidratadas foi determinado o teor de humidade após 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h.



Figura 3.1 - Demolha do grão de trigo sarraceno

Determinação Humidade após demolha:

Colocaram-se 12 cápsulas de níquel (6 para cada temperatura de demolha), com aproximadamente 5 g de amostra, numa estufa de ar seco (Heraeus Instruments, Hanau, Germany) a 102 °C durante 2 horas. As cápsulas foram deixadas a arrefecer no excicador e pesadas hora a hora até se obter peso constante. Este método da AOAC 952.08 (AOAC, 2000) tem como fim evaporar a água das amostras, pesando consecutivamente, até à obtenção de peso constante. O procedimento detalhado encontra-se no anexo I.

O teor de água/humidade em gramas por 100 g de amostra é calculado da seguinte forma:

$$\frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde:

m_0 – massa da cápsula de metal (em gramas)

m_1 – massa da cápsula de metal com a amostra (g)

m_2 – massa da cápsula de metal com a amostra após atingir peso constante (g)

3.1.2 Germinação

Demolharam-se os grãos de TS, durante o tempo estabelecido em 3.1.1, em ambas as temperaturas e procedeu-se à sua germinação em placas de petri com papel de filtro a 3 temperaturas diferentes (18 °C, 23 °C, 28° C) durante 72h, como exemplificado na figura 3.3. Este processo deu-se na ausência de luz, e em ambiente húmido (Hager et al., 2014). Para garantir a humedidade das sementes, adicionaram-se 5 ml de água de 12h em 12 h durante todo o processo. A amostras foram recolhidas às 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. O procedimento realizado encontra-se descrito no esquema da figura 3.2:

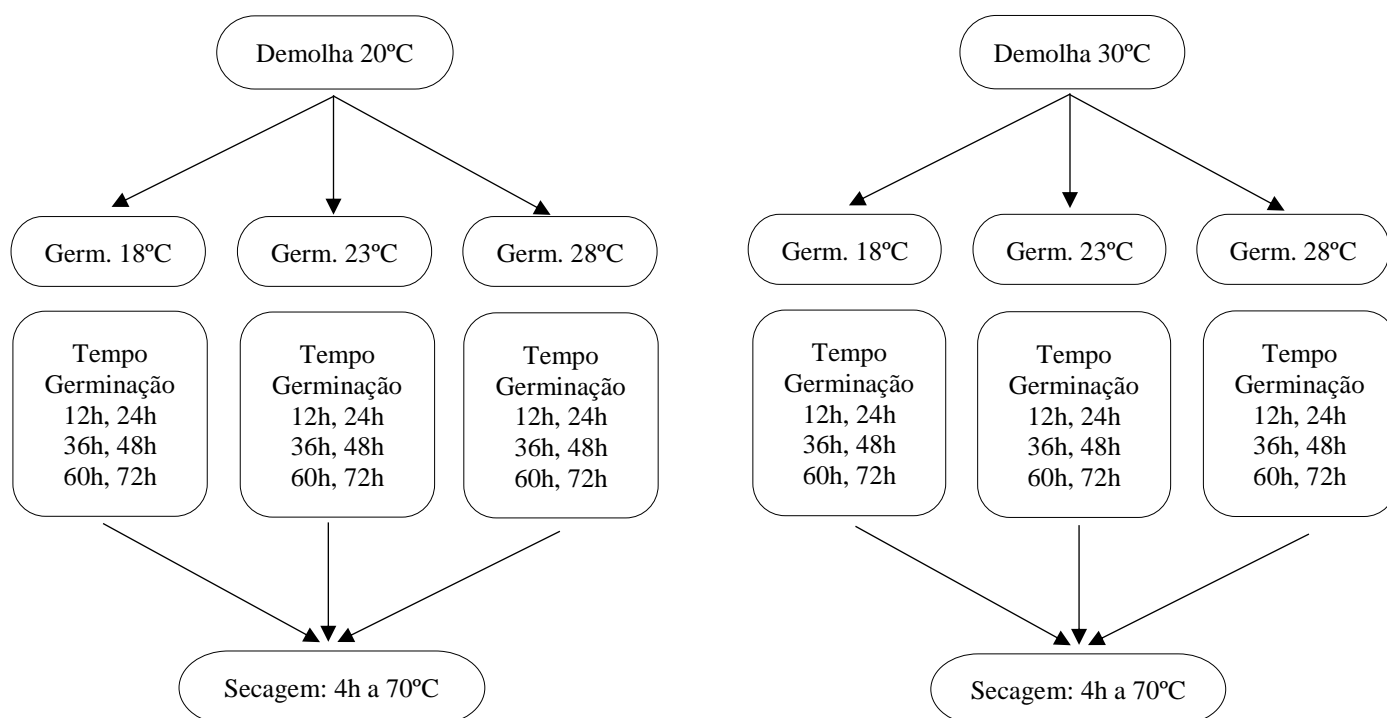


Figura 3.2 - Esquema do procedimento realizado

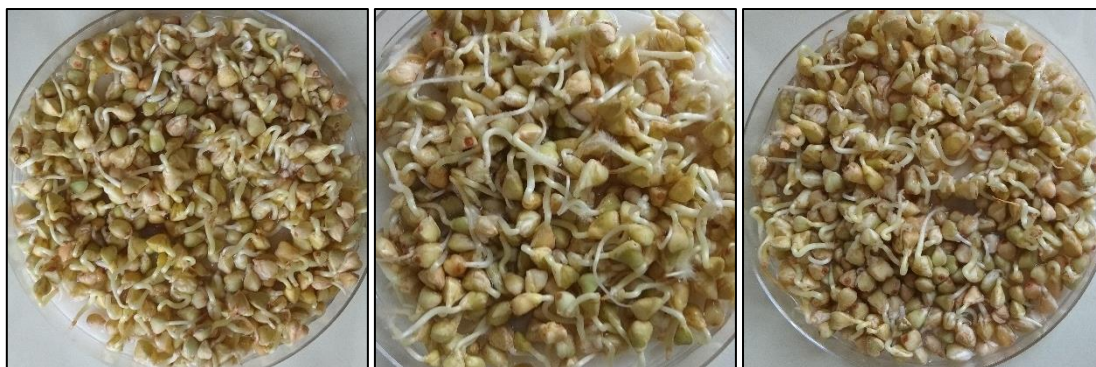


Figura 3.3 - Grãos de trigo sarraceno germinados

3.1.3 Secagem

Para o processo de secagem, foi definida uma temperatura de 70 °C (Terpinc et al., 2016) (Klose et al., 2009) e testados diferentes tempos de secagem, até se obter um teor de humidade entre 5-10% (Patricia et al., 2005), como demonstrado na figura 3.4. Para o cálculo da humidade, utilizou-se mais uma vez o método da AOAC (Anexo I), com vista à obtenção de peso constante.



Figura 3.4 - Grãos de trigo sarraceno maltados

3.2 Determinação da proteína total

A proteína total foi determinada para todas as amostras de acordo com o método de Kjeldahl, que consiste em três diferentes passos: digestão, destilação e titulação.

Numa primeira fase, o azoto orgânico é digerido com ácido sulfúrico, uma mistura catalisadora e sulfato de amónio numa unidade de digestão Foss Tecator 2006 Digestor (Höganäs, Suécia), como o apresentado na Figura 3.5 até atingir uma cor azul clara, Figura 3.6.



Figura 3.5 - Digestão de compostos orgânicos com azoto (Início)



Figura 3.6 - Digestão de compostos orgânicos com azoto (Fim)

Para a libertação do amoníaco, procedeu-se à destilação com sulfato de amónio, utilizando uma unidade Foss 2800 Kjeltex AutoDistillation (Foss Tecator), onde se dá a viragem para pH alcalino de azul para castanho (figura 3.7).



Figura 3.7 – Destilação de compostos orgânicos com sulfato de amónio

O amoníaco libertado é, então, medido por titulação, com um sistema de titulação automático Titrand 808 da Metrohm (AOAC 991.20, 2000).



Figura 3.8 - Equipamento utilizado na aplicação do método Kjeldahl

Para o cálculo do teor proteico, utilizou-se o factor de Jones de 6,25 para conversão de pseudocereais, segundo (FAO, 1973). O resultado é expresso em g por 100 g, com base no peso fresco. O procedimento em detalhe encontra-se no anexo II.

3.3 Quantificação de aminoácidos

Pesaram-se três porções de teste, de 30 mg, em viais de quartzo adequados para o processo de digestão e adicionou-se 200 μ L de padrão interno (25 mM de D-Norvalina) e 1 mL de ácido clorídrico, HCl, (6 N), contendo 0,5% de fenol. Procedeu-se, então, à hidrólise das amostras com recurso a um microondas Milestone ETHOS 1, em condições anaeróbias, utilizando purgas de azoto e uma bomba de vácuo no programa já pré-estabelecido (15 min para atingir 160 °C, 10 min a 160 °C e 30 min de arrefecimento). Após a hidrólise, retiraram-se as amostras do microondas, neutralizaram-se com 1 mL de hidróxido de sódio, NaOH (6 N) e filtraram-se os hidrolisados, com um filtro comum, Figura 3.9.

Para o processo de derivatização, adicionaram-se 80 μ L de solução tampão, 10 μ L de solução e 20 μ L de reagente reconstituído num vial, agitou-se a solução utilizando um vortex e aqueceu-se a mesma até uma temperatura constante de 55 °C durante 10 min.

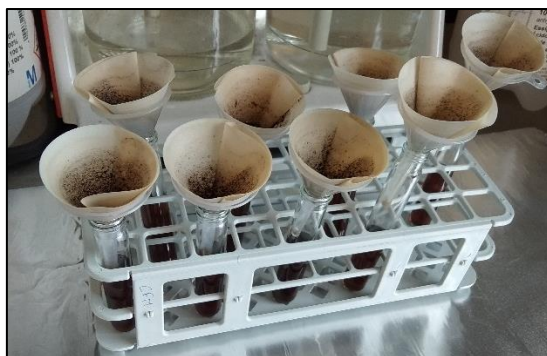


Figura 3.9 - Filtração dos hidrolisados

A determinação cromatográfica foi realizada num sistema Acquity UPLC da Waters, equipado com um detector de matriz de fotodíodo e uma coluna BEH C18 com um caudal 0,7 mL/min e uma temperatura de 55 °C. Foi programado um comprimento de onda de 260 nm. Utilizaram-se os eluentes AccQTag ultra eluente A diluído em 95% de água e AccQTag ultra eluente B, com as seguintes condições de gradiente: 0– 0.54 min, 99.9% A–0.1% B; 5.74 min, 90.9% A–9.1% B; 7.74 min, 78.8% A–21.2% B; 8.04 min, 40.4% A–59.6% B; 8.70–10 min, 99.9% A–0.1% B.

O processo de quantificação foi realizado com uma curva de calibração preparada a partir de uma solução contendo 2.5 mM de cada aminoácido, diluído em concentrações apropriadas. Adicionou-se D-Norvalina para uma concentração final de 45.5 pmol.

Os cálculos foram realizados no *software Empower* da Waters e os aminoácidos de derivatização foram identificados e quantificados por comparação com os tempos de retenção e os rácios das áreas da mistura padrão de aminoácidos com o padrão interno. Os resultados expressam-se em mg por 100 g (Mota et al., 2016). Os detalhes do processo encontram-se no anexo III.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* Statistica 7 (Statsoft Ibérica, Lisboa, Portugal) e teve como principais etapas, a construção da ANOVA e das análises de superfície de resposta, a fim de determinar os fatores significativos e, por sua vez, a melhor combinação de níveis para as características analisadas, sendo estas a Proteína Total pelo método Kjeldahl, a Proteína Total enquanto soma dos Aminoácidos e os aminoácidos essenciais, com exceção do Triptofano. De forma a validar o estudo efetuado, procedeu-se, de seguida, à validação dos pressupostos da análise da variância.

3.5 Controlo da qualidade microbiológica dos germinados

Para garantir a qualidade da semente após a sua germinação, sabendo que a maioria dos estudos realizados anteriormente tinham como base temperaturas mais baixas do que as utilizadas no presente estudo, recolheram-se amostras de 10 g após a demolha e a cada 24 h após o início da germinação para análise microbiológica, com foco em bolores e leveduras.

O material utilizado faz parte do conjunto que se deve encontrar, geralmente, num laboratório de microbiologia, de acordo com a norma ISO 7218, particularmente:

1. Incubadora, capaz de operar a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Pipetas estéreis, de 1 mL de capacidade e graduadas, com divisões de 0,1 mL;
3. Banho de água, ou algo similar, capaz de operar entre $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $47\text{ }^{\circ}\text{C}$;
4. Medidor de pH, com uma precisão de 0,1 unidades de pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
5. Garrafas, frascos e tubos, para ferver e armazenar meios de cultura, e para fazer diluições;
6. Placas de Petri, estéreis, de vidro ou plástico, com um diâmetro entre 90 mm a 100 mm;
7. Microscópio, para distinguir leveduras de células de bactérias
8. Espalhadores, de plástico ou metal, com um diâmetro menor do que 2 mm e comprimento de 80 mm.
9. Lupa, para discriminar e diferenciar colónias/células de leveduras de bolores.

Também a preparação da amostra foi feita com base na norma ISO 7218, onde se realizaram três diluições a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Para a primeira diluição, adicionaram-se 10 g de amostra e 90 g de água peptonada e homogeneizou-se com recurso a um homogeneizador peristáltico por 1 min. Para a segunda diluição, adicionou-se 1 ml da primeira diluição (10^{-1}) a 9 ml de água peptonada num tubo de ensaio e homogeneizou-se com recurso ao vortex mixer. A terceira diluição foi feita da mesma forma que a anterior mas utilizando como base a segunda diluição (10^{-2}).

Tabela 3.1 - Quantidades de meio utilizadas na inoculação

Placa	Diluição	Quantidade (mL)	} Perfazer 1mL no total
1	10^{-1}	0,3	
2	10^{-1}	0,3	
3	10^{-1}	0,4	
4	10^{-1}	0,1	
5	10^{-2}	0,1	
6	10^{-3}	0,1	

De seguida, inocularam-se 6 placas de petri, com base na norma ISO 21527-1, em meio Ágar DRBC, para a quantificação de leveduras e bolores, da forma discriminada na Tabela 3.1.

As amostras foram deixadas numa incubadora aeróbica a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias, tendo em conta a norma ISO 21527-1 de 2008. Após este tempo, foi realizada a contagem de leveduras e bolores em cada uma das placas, de acordo com a norma ISO 7218, assim como a expressão de resultados (Figura 3.10)

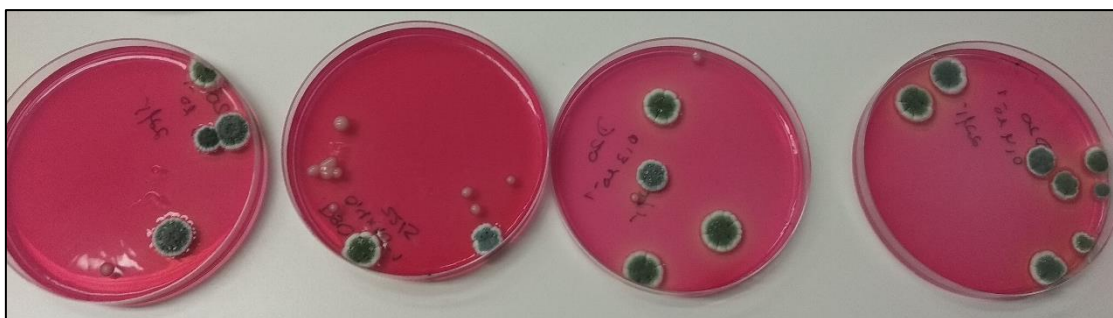


Figura 3.10 - Placas de Petri após inoculação

O número de microorganismos, N , presente numa amostra é calculado como uma média de duas diluições sucessivas:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (3.2)$$

Onde:

$\sum C$ - corresponde à soma das colónias contadas, quando pelo menos uma contém no mínimo 10 colónias

V - é o volume de inóculo colocado em cada prato, em mL;

d - diz respeito à diluição correspondente à primeira diluição retida.

O resultado é arredondado, com dois algarismos significativos, como um número entre 1,0 e 9,9, com a respectiva potência de 10 apropriada e apresentado como número de microorganismos por mililitros.

Os critérios a considerar para as Leveduras e Bolores encontram-se discriminados na Tabela 3.2:

Tabela 3.2 - Critérios de satisfação para bolores e leveduras

Critérios	Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório
Leveduras	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^5$	$> 10^5$
Bolores	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3$

4. Apresentação e discussão de resultados

4.1 Determinação do tempo de demolha

A primeira parte deste estudo, como já foi referido anteriormente, consistiu na determinação do tempo de demolha. Isto é, tendo em conta duas temperaturas pré-definidas, avaliou-se o teor de humidade para cada uma delas ao longo do tempo. Inicialmente e como ponto de referência, mediu-se o teor de humidade da semente crua. De seguida, demolharam-se as sementes a 20 °C e 30 °C e retiraram-se amostras durante 24 h.

Para o período inicial, o intervalo entre amostras foi menor, pois sabia-se à partida que a maior evolução seria durante este período. Os valores obtidos encontram-se discriminados na Tabela 4.1 e expostos graficamente no gráfico 4.1.

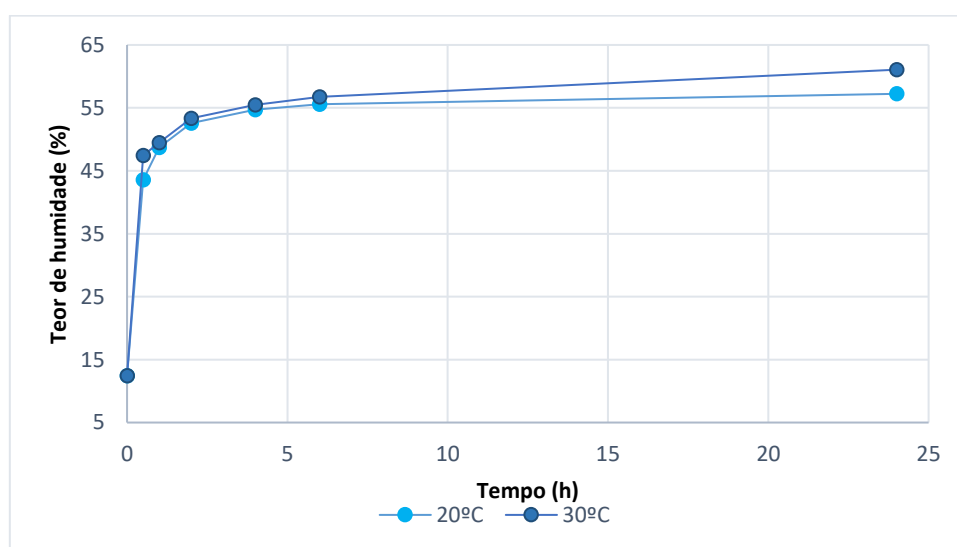


Figura 4.1 – Evolução do teor de humidade durante a demolha

Numa primeira análise, a maior discrepância observável dá-se durante a primeira hora da etapa, onde a evolução é significativa e o teor de humidade do trigo sarraceno aumenta cerca de 250% relativamente ao grão cru. Após 2 h de demolha, o objetivo inicial já tinha sido atingido (%T.H. \geq 50%), sendo que a partir deste momento, as alterações são praticamente inexistentes, principalmente a partir das 6 h onde o conteúdo da amostra se revela bastante semelhante ao observado 24 h após o início da demolha. Considerou-se, então, um tempo de demolha de 2 h para as restantes maltagens.

Uma análise semelhante foi efetuada por Wijngaard, et al., 2005, que ao estudar o efeito na demolha na qualidade final do TS maltado, manteve uma temperatura de 10°C constante e verificou o teor de humidade durante 80 h, obtendo 35% em 7 h de demolha, 40% em 13 h e 45% em 80 h. Também neste estudo, a maior evolução se deu nas primeiras horas (13 h), onde o teor de humidade aumentou de 11.73% para 40.02%. No entanto, neste caso específico, os

grãos foram demolhados a uma temperatura bastante mais baixa (10 °C) e, portanto, foram necessárias 80 h para atingir um teor de 45% de humidade.

Tabela 4.1 - Teor de humidade com demolha a 20 °C e 30 °C (%)

Tempo (h)	20°C	30°C
0	12,4	12,4
0.5	43,6	47,4
1	48,7	49,5
2	52,6	53,4
4	54,7	55,5
6	55,6	56,7
24	57,2	61,1

As diferenças entre ambas as temperaturas de demolha não são facilmente visíveis quando se observam as representações gráficas de cada uma delas (Figura 4.1), pois o seu desenvolvimento é bastante semelhante. No entanto, fazendo uma análise mais cuidada à Tabela 4.1, verifica-se que quanto maior a temperatura de demolha, maiores são os teores de humidade atingidos ao longo do tempo, de onde se conclui que para temperaturas mais altas, mais rapidamente se dá a absorção de água por parte do grão.

4.2 Determinação do tempo de secagem

Após a germinação a diferentes temperaturas, procedeu-se à maltagem da semente a temperatura constante de 70 °C. Com o objetivo de atingir um teor de humidade inferior a 10%, retiraram-se amostras 4 h, 5 h e 6 h após o início da secagem. Os valores obtidos encontram-se representados graficamente na Figura 4.2.

Devido à utilização de uma temperatura elevada, assim como uma monitorização um pouco mais tardia, não é possível observar as três fases da secagem. No entanto, é perceptível a fase de *Bound Drying*, onde o teor de humidade varia pouco e se encontra abaixo dos 10%. É esta a fase final da secagem e caracteriza-se pela remoção da água intracelular do grão (Patricia et al., 2005).

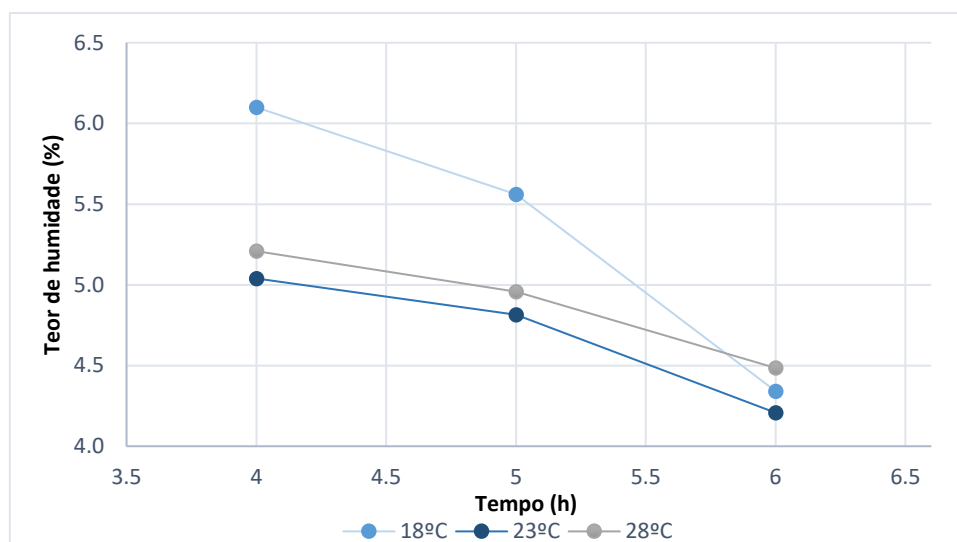


Figura 4.2 - Evolução do teor de humidade durante a secagem

Como se pode observar, após 4 h na estufa de secagem, o teor de humidade do grão já se encontra entre 5-10%, como pretendido, e, portanto, foi este o tempo considerado ao longo do procedimento.

4.3 Proteína

4.3.1 Proteína total

Os resultados da proteína total, determinados pelo método Kjeldahl, encontram-se apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Teor proteico do TS maltado

Temperatura de germinação (°C)	Duração da germinação (h)	Demolha a 20°C (g/100g)	Demolha a 30°C (g/100g)
18	24	14,2	15,3
	48	12,3	15,4
	72	11,6	13,9
23	24	10,0	15,3
	48	10,2	12,3
	72	13,5	12,3
28	24	12,4	13,6
	48	10,9	11,1
	72	13,6	14,1

Numa primeira análise, observa-se um teor proteico superior para uma temperatura de demolha igual a 30 °C. Calculando a média para cada uma das demolhas, obtém-se 12,08 ($\pm 1,43$) g/100g para a demolha a 20 °C e 13,7 ($\pm 1,45$) g/100g a 30 °C, o que demonstra, apesar de não ser possível tirar conclusões sem efetuar a priori uma análise estatística, que, temperaturas de demolha mais elevadas, poderão proporcionar maiores quantidades de proteína nos grãos do trigo sarraceno.

Quanto às restantes variáveis, temperatura e tempo de germinação, não é possível, por observação direta, fazer distinções, uma vez que os valores são próximos e não apresentam nenhum padrão, o que poderá dever-se ao facto de o método utilizado pressupor algumas perdas e contaminações.

Contabilizando todas as amostras, obtém-se uma média de 12,89 ($\pm 1,65$ g/100g) para o teor proteico do trigo sarraceno maltado, um valor mais elevado, tal como se esperaria, que o encontrado por Bonafaccia & Fabjan, 2003 para TS comum cru (11 g/100g), mas um pouco mais baixo do que o valor determinado por Mota et al., 2016 mesmas condições (13,1 g/100g). No entanto, esta comparação é pouco conclusiva, uma vez que o desvio padrão obtido é alto, pois contém todo o TS, onde existem amostras com diferentes características.

4.3.2 Análise comparativa entre a proteína total e a soma dos aminoácidos

Sabendo que a soma total dos aminoácidos corresponde ao valor da proteína total, pode-se considerar que foram utilizados dois métodos para a determinar: o primeiro, através do método Kjeldahl, que já foi anteriormente referido, e o segundo pelo método da quantificação de aminoácidos. Na Tabela 4.3, encontram-se discriminados os valores encontrados para ambos os métodos, apresentados em g por 100 g de amostra de trigo sarraceno.

Apesar de alguns valores serem relativamente próximos, a maior parte difere bastante, sendo que os valores obtidos como a soma dos aminoácidos (AA) apresentam-se, na grande maioria, superior. Isto deve-se a possíveis perdas, que deverão acontecer, em especial no método de Kjeldahl. O facto de na determinação da proteína total usarmos fatores de correção (não específico para trigo sarraceno), para a transformação do azoto proteico em proteína, e por só existir uma medição para cada amostra não se tratando de réplicas puras, como se falará mais à frente, poderá levar a resultados pouco precisos.

Tabela 4.3 - Teor proteico obtido pelo método Kjeldahl e pela soma dos aminoácidos (g/100g)

Demolha		Germinação		
Temperatura (°C)	Duração (h)	Temperatura (°C)	PT (g/100g)	Soma AA (g/100g)
20	24	18	14,2	14,9
		23	10,0	10,5
		28	12,4	14,6
	48	18	12,3	15,5
		23	10,2	14,9
		28	10,9	13,0
	72	18	11,6	13,4
		23	13,5	9,6
		28	13,6	11,7
30	24	18	15,3	11,8
		23	15,3	12,9
		28	13,6	11,5
	48	18	15,4	12,2
		23	12,3	12,6
		28	11,1	13,4
	72	18	13,9	15,3
		23	12,3	12,7
		28	14,1	15,1

4.4 Aminoácidos

4.4.1 Análise comparativa entre trigo sarraceno cru e maltado

Numa primeira análise, considerou-se a totalidade das amostras maltadas, sem distinção alguma das suas fases de maltagem. O principal objetivo, nesta fase, é observar as diferenças entre os aminoácidos essenciais no TS cru e maltado. O triptofano (Trp) não foi considerado neste estudo, uma vez que necessita de uma hidrólise alcalina em condições anaeróbias, cujas instalações não estavam disponíveis. As médias e desvio-padrão apresentados encontram-se em mg/100g de amostra.

As diferenças mais notáveis verificam-se para os aminoácidos Leu, Lys, onde o seu conteúdo é superior no grão maltado, e Phe e Met, onde acontece o oposto. Leu tem um papel importante na síntese proteica (Norton & Layman, 2006) e é o primeiro aminoácido limitante nalguns cereais,

como o trigo (Pomeranz Yeshajahu, 1959). Met é conhecido por ser uma das maiores fontes de enxofre, assim como Cys. Val é um aminoácido alifático, semelhante a Leu e Ile na estrutura e função (Mota et al., 2016).

Tabela 4.4 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para o TS cru e maltado (g/ 100g)

Aminoácido	TS Cru	TS Maltado
His	363 ± 25	311 ± 49
Ile	407 ± 21	392 ± 60
Leu	779 ± 14	869 ± 101
Lys	536 ± 46	663 ± 106
Met	268 ± 14	200 ± 46
Phe	694 ± 54	619 ± 82
Thr	443 ± 5	450 ± 55
Val	513 ± 4	529 ± 72

Analisando a Tabela 4.4, verifica-se, ainda, que para o caso do TS maltado, alguns aminoácidos apresentam um desvio-padrão um pouco elevado, como é o caso da Metionina, com um coeficiente de variação de 23% e da Lisina com 16,1%, enquanto para o TS cru, o coeficiente de variação mais elevado é de 8,7%. Isto deve-se ao facto do TS maltado conter todas as amostras, sem discriminar por temperatura de demolha, de germinação ou tempo de germinação.

4.4.2 Análise comparativa entre temperaturas de demolha

De seguida, procedeu-se à comparação entre as médias para ambas as temperaturas de demolha. Nesta situação, também serão visíveis elevados coeficientes de variação, uma vez que em cada demolha estão presentes seis diferentes tempos e temperaturas de germinação.

Tabela 4.5 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as diferentes demolhas (g/100g)

Aminoácido	Demolha 20°C	Demolha 30°C
His	316 ± 54	307 ± 44
Ile	397 ± 67	388 ± 53
Leu	879 ± 112	860 ± 88
Lys	681 ± 116	645 ± 93
Met	204 ± 48	197 ± 45
Phe	626 ± 95	614 ± 66
Thr	455 ± 61	445 ± 48
Val	537 ± 82	521 ± 60

Nesta divisão dos dados, não são facilmente visíveis as diferenças entre as temperaturas de demolha, pois, as médias são bastante semelhantes entre ambas. Posteriormente, avaliar-se-á se a concentração de cada aminoácido essencial (AAE) difere significativamente entre blocos.

4.4.3 Análise comparativa entre temperatura e tempo de germinação

Uma vez feita a distinção entre ambas as temperaturas de demolha, analisou-se o comportamento dos aminoácidos essenciais para as diferentes temperaturas e tempo de demolha. Foram calculados a média e desvio-padrão, em mg/ 100g de amostra, para cada temperatura e tempo de germinação (n=2) e para as amostras de trigo sarraceno cru (n=6).

Demolha 20°C

As médias e desvio-padrão para as amostras demolhadas a 20 °C encontram-se sumarizadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as amostras demolhadas a 20°C - a azul, as melhores respostas encontradas para cada temperatura de germinação (g/ 100g)

		His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
Cru		364 ± 25	407 ± 21	779 ± 15	537 ± 47	269 ± 14	694 ± 55	443 ± 5	513 ± 5
18°C	24h	296 ± 0	378 ± 0	927.86 ± 0.97	715 ± 1	194 ± 2	647 ± 0	485 ± 1	522 ± 1
	48h	395 ± 0	502 ± 0	1034 ± 1	853 ± 0	259 ± 1	750 ± 0	543 ± 0	662 ± 0
	72h	344 ± 2	372 ± 0	886 ± 1	704 ± 1	246 ± 1	644 ± 0	463 ± 3	516 ± 1
23°C	24h	199 ± 3	271 ± 15	683 ± 37	491 ± 64	122 ± 19	456 ± 11	342 ± 26	377 ± 24
	48h	377 ± 0	494 ± 1	1016 ± 0	827 ± 4	250 ± 0	722 ± 0	522 ± 4	652 ± 1
	72h	251 ± 0	318 ± 0	678 ± 0	582 ± 0	169 ± 0	442 ± 0	355 ± 0	427 ± 0
28°C	24h	270 ± 1	358 ± 0	888 ± 0	730 ± 0	183 ± 1	591 ± 0	464 ± 2	501 ± 0
	48h	343 ± 2	442 ± 0	911 ± 1	709 ± 1	220 ± 0	647 ± 0	469 ± 0	584 ± 1
	72h	295 ± 1	326 ± 1	782 ± 1	638 ± 1	207 ± 1	558 ± 0	397 ± 2	461 ± 2

Observando os valores obtidos, é possível constatar que, para a maior parte dos aminoácidos, contrariamente ao que se tinha observado anteriormente, o coeficiente de variação, que corresponde à razão entre o desvio-padrão e a média, é praticamente nulo em relação à respetiva média, com exceção da amostra correspondente a uma germinação a 23 °C durante 24 h, onde é superior a 10% para a lisina (12,94%) e metionina (15,45%), sendo estes valores ainda relativamente baixos. Isto deve-se ao facto de as réplicas não serem verdadeiras, isto é,

as réplicas referem-se a uma repetição da medição, e não a uma repetição de todo o procedimento desde o início.

Relativamente à comparação entre os tempos de germinação a uma demolha de 20 °C, é possível observar que, a todas as temperaturas de germinação analisadas, o teor de cada aminoácido é superior para um tempo de germinação de 48 h. Quando comparadas as temperaturas de germinação, observam-se valores mais altos para uma temperatura de 18°C. Prevê-se, assim, que com uma demolha a 20 °C, uma germinação a 18 °C durante 48 h produzirá conteúdos de aminoácidos essenciais mais interessantes. Comparando estes teores de aminoácidos com os observados para o TS cru, verifica-se que são superiores para todos os AA, com exceção da Met, que apesar de superior para a média das amostras cruas, apresenta valores bastante semelhantes em ambas as situações. É, no entanto, necessário realizar testes estatísticos para averiguar se estes fatores são realmente significativos.

Demolha 30°C

Na Tabela 4.7, encontram-se as médias e desvio-padrão para as amostras demolhadas a 30 °C.

Assim, como na demolha a 20 °C, também o coeficiente de variação das amostras demolhadas a 30 °C é reduzido, sendo muitas vezes, aproximadamente nulo, pelos motivos já explicados anteriormente.

Tabela 4.7 - Média e desvio-padrão do teor de aminoácidos essenciais para as amostras demolhadas a 30°C - a azul, as melhores respostas encontradas para cada temperatura de germinação (g/ 100g)

		His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
Cru		364 ± 25	407 ± 22	779 ± 15	537 ± 47	269 ± 14	694 ± 55	443 ± 5	513 ± 4
18°C	24h	228 ± 0	305 ± 1	763 ± 1	551 ± 2	140 ± 1	521 ± 0	390 ± 1	423 ± 1
	48h	313 ± 0	404 ± 1	838 ± 2	693 ± 1	201 ± 2	585 ± 0	434 ± 3	537 ± 1
	72h	362 ± 16	449 ± 25	1028 ± 1	815 ± 33	261 ± 5	719 ± 0	534 ± 17	584 ± 22
23°C	24h	260 ± 4	335 ± 7	838 ± 15	595 ± 42	163 ± 1	595 ± 2	431 ± 8	467 ± 11
	48h	338 ± 3	418 ± 1	868 ± 0	675 ± 0	250 ± 0	641 ± 0	447 ± 0	556 ± 1
	72h	337 ± 2	466 ± 1	937 ± 1	713 ± 1	213 ± 0	639 ± 1	481 ± 1	621 ± 2
28°C	24h	221 ± 1	295 ± 1	744 ± 1	513 ± 0	150 ± 2	520 ± 1	382 ± 0	413 ± 0
	48h	342 ± 1	360 ± 1	868 ± 0	697 ± 1	245 ± 0	648 ± 1	464 ± 1	506 ± 0
	72h	364 ± 11	457 ± 23	1011 ± 12	785 ± 26	256 ± 16	676 ± 10	525 ± 6	562 ± 11

Analisando a Tabela 4.7, verifica-se que, para uma temperatura de demolha de 30 °C, a todas as temperaturas observadas, é às 72 h de germinação que se obtém os maiores teores de cada aminoácido. As exceções, neste caso, são a metionina e a fenilalanina, a uma temperatura de 23 °C, que apresentam valores superiores às 72 h de germinação, apesar de para a Phe a diferença ser relativamente pequena. Distinguindo agora as diferentes temperaturas de germinação, não é possível tirar conclusões acerca de qual seria a melhor, neste caso, uma vez que estas diferem para os diferentes aminoácidos.

4.5 Análise estatística

Para o desenho de experiências aplicado, com o objetivo de otimizar a maltagem do TS, foram estudados 2 fatores, a temperatura (°C) e o tempo (h) de germinação, com 3 níveis cada, apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Níveis dos fatores estudados

	Temperatura (°C)	Tempo (h)
Nível	A	B
-1	18	24
0	23	48
1	28	72

O estudo para a proteína foi realizado em 2 blocos, que contemplam duas temperaturas de demolha diferentes (20 °C e 30 °C), perfazendo um total de $9 \times 2 = 18$ experiências, como se apresenta na Tabela 4.9. Relativamente aos aminoácidos, consideraram-se 2 réplicas, obtendo-se um total de 36 experiências.

Idealmente as experiências deveriam ser executadas de forma aleatória, de forma a evitar qualquer influência nas suas respostas. No entanto, para este procedimento não foi possível uma vez que o mesmo só foi realizado uma vez e as amostras se retiraram sequencialmente durante a germinação do trigo sarraceno.

De forma a validar os dados obtidos a partir deste planeamento, verificaram-se os pressupostos da análise da variância para o teor proteico e para os aminoácidos essenciais (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr e Val) e procedeu-se à análise da variância para todos os DOE e das respetivas superfícies de resposta, de forma a determinar quais os melhores níveis para cada uma das características observadas.

Tabela 4.9 - DOE aplicado no presente estudo

Demolha 20°C				Demolha 30°C			
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo
1	-1 -1	-1	-1	10	-1 -1	-1	-1
2	0 -1	0	-1	11	0 -1	0	-1
3	+1 -1	+1	-1	12	+1 -1	+1	-1
4	-1 0	-1	0	13	-1 0	-1	0
5	0 0	0	0	14	0 0	0	0
6	+1 0	+1	0	15	+1 0	+1	0
7	-1 +1	-1	+1	16	-1 +1	-1	+1
8	0 +1	0	+1	17	0 +1	0	+1
9	+1 +1	+1	+1	18	+1 +1	+1	+1

As respostas obtidas para a proteína e aminoácidos essenciais, a partir dos quais se efetuou o presente estudo encontram-se no Anexo IV, Tabelas 1 a 9.

4.5.1 Análise da variância

Tal como já foi referido, procedeu-se à análise da variância para as características já referidas, com o objetivo de determinar os efeitos significativos para cada uma delas, que se encontram resumidos na Tabela 4.12. Com este fim, elaborou-se então a ANOVA em primeiro lugar, seguida pela ANOVA condensada para confirmar os efeitos significativos detetados à partida e por fim, analisou-se as superfícies de resposta.

A título de exemplo, demonstrar-se-á a análise da variância para a Histidina, que servirá de exemplo para todo o procedimento. As análises de variância para as restantes características, cujo procedimento foi realizado de forma análoga, encontram-se no Anexo VI (página 97 a 105).

Seguidamente, determinar-se-á a melhor combinação de níveis para cada uma das características em análise.

Metionina

ANOVA

Analisando a ANOVA construída para a metionina, observa-se que apenas o tempo de germinação é significativo. De forma a confirmar a sua significância, procedeu-se à construção da ANOVA condensada.

Tabela 4.10 - ANOVA para a Metionina retirada do Statistica

ANOVA; Var.:His; R-sqr=,71773; Adj:,62002 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=1251,38 DV: His					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	3,3	1	3,35	0,00267	0,959158
(1)Tempo Germinação L+Q	73034,4	2	36517,21	29,18154	0,000000
(2)Temperatura de Germinação L+Q	5196,3	2	2598,16	2,07623	0,145699
1*2	4495,3	4	1123,81	0,89806	0,479335
Error	32535,9	26	1251,38		
Total SS	115265,2	35			

ANOVA Condensada

Tabela 4.11 - ANOVA condensada para a Metionina retirada do Statistica

ANOVA; Var.:His; R-sqr=,63365; Adj:,5993 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=1319,608 DV: His					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	3,3	1	3,35	0,00254	0,960155
(1)Tempo Germinação L+Q	73034,4	2	36517,21	27,67277	0,000000
Error	42227,5	32	1319,61		
Total SS	115265,2	35			

Confirma-se, assim, a significância do mesmo.

Superfície de resposta

De modo a atestar se, de facto, se detectaram os melhores níveis para cada característica, recorre-se à metodologia de superfície de resposta.

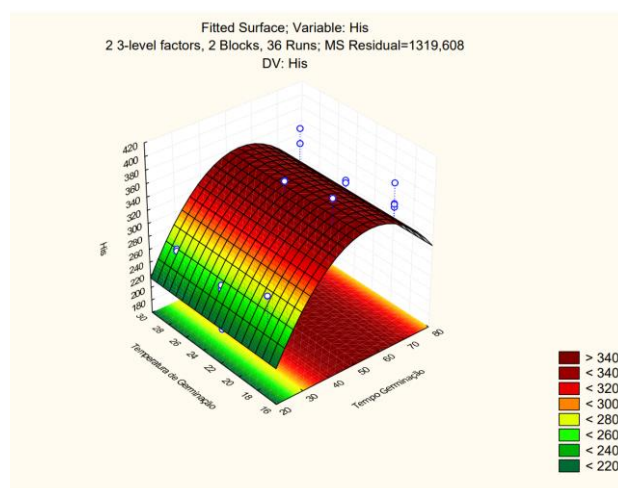


Figura 4.3 - Superfície de resposta para a Metionina

Efeitos significativos para cada uma das características

Após a análise da variância e das superfícies de resposta para todas as características, identificaram-se os efeitos significativos para cada uma delas. Estes resultados encontram-se discriminados na Tabela 4.12.

Tabela 4.10 - Resumo dos efeitos significativos para as características analisadas

	Blocos	Temperatura	Tempo	Interação
Proteína Total	✓	✗	✗	✗
Soma AA	✗	✗	✗	✗
His	✗	✗	✓	✗
Ile	✗	✗	✓	✗
Leu	✗	✗	✓	✗
Lys	✗	✗	✓	✗
Met	✗	✓	✓	✓
Phe	✗	✗	✓	✗
Thr	✗	✗	✓	✗
Val	✗	✗	✓	✗

Proteína Total

Conclui-se assim que, para a proteína total, apenas os blocos são significativos. De forma a seleccionar a melhor combinação de níveis, somam-se todas as respostas relativas a cada nível

de cada fator, confirmando se as superfícies de resposta, que se encontram no Anexo VI, corroboram a análise elaborada.

Neste caso, somaram-se as respostas correspondentes apenas às diferentes temperaturas de demolha, obtendo-se a Tabela 4.13.

Tabela 4.11- Identificação do melhor nível da temperatura de demolha para a proteína total

20 °C	108.59
30 °C	123.29

Sendo a seleção do melhor nível feita através da escolha do nível com um valor superior de resposta, verifica-se, assim, que uma demolha a 30°C será preferível quando se visa obter teores proteicos mais elevados. Quanto aos restantes fatores, uma vez que não se revelam significativos, o nível escolhido deverá ser o mais económico. Este nível mais económico, para a temperatura, não será discriminado uma vez que dependerá das condições meteorológicas a que o procedimento estará sujeito na altura. Relativamente ao fator tempo, à partida, o nível mais económico será o nível -1 (ou 24 h), pois a estufa seria utilizada durante uma janela de tempo mais curta.

Tabela 4.12 - Melhor combinação de níveis para a proteína total

Temperatura de Demolha	Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação
30 °C	+ económico	24 h

Soma AA

A situação relativa à proteína total, enquanto soma dos AA, é análoga à descrita para os fatores tempo e temperatura de germinação no caso da proteína. Visto que nenhum dos fatores é significativo, opta-se pelos níveis mais económicos. Como já foi referido, para a temperatura de germinação, também o nível mais económico de temperatura de demolha não poderá ser identificado, uma vez que está dependente das condições climáticas.

Tabela 4.13 - Melhor combinação de níveis para a soma dos AA

Temperatura de Demolha	Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação
+ económico	+ económico	24 h

His, Ile, Lys, Phe, Thr, Val e Leu

Os casos da histina, isoleucina, lisina, fenilalanina, trionina e valina são semelhantes, sendo apenas o tempo de germinação fator significativo em todos eles. Quanto à leucina, apesar de através da ANOVA condensada não se obter nenhum fator significativo, pela análise da superfície de resposta, o tempo de germinação parece influenciar as respostas obtidas. Desta forma, considerou-se que este também seria significativo.

O método utilizado foi análogo para todos e correspondeu à soma de todas as respostas para cada um dos níveis do fator, -1 (24 h), 0 (48 h) e 1 (72 h), verificando-se, de seguida, para qual se obtinha um valor mais elevado. Os valores obtidos encontram-se discriminados nas Tabelas 4.14, 4.15, 4.16.

Tabela 4.14 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a His, Iso e Lis

Histidina		Isoleucina		Lisina	
-1 (24h)	2947.95	-1 (24 h)	3882.9	-1 (24 h)	7189.7
0 (48h)	4218.65	0 (48 h)	5240.8	0 (48 h)	8908.0
1 (72h)	3905.17	1 (72 h)	4775.4	1 (72 h)	8475.1

Tabela 4.15 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a Phe e Thr

Fenilalanina		Trionina	
-1 (24 h)	6659.6	-1 (24 h)	4990.2
0 (48 h)	7986.0	0 (48 h)	5757.7
1 (72 h)	7354.2	1 (72 h)	5508.1

Tabela 4.16 - Identificação do melhor nível do tempo de germinação para a Val e Leu

Valina		Leucina	
-1 (24 h)	5404.1	-1 (24 h)	5404.1
0 (48 h)	6993.8	0 (48 h)	6993.8
1 (72 h)	6342.7	1 (72 h)	6342.7

Verifica-se, assim, que para todas as características aqui analisadas, o melhor nível para o tempo de germinação será o nível 0, correspondente a um tempo de 48 h. Para os restantes fatores, mais uma vez considera-se o nível mais económico. A melhor combinação de níveis para estes aminoácidos encontra-se, assim, na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 - Melhor combinação de níveis para a His, Ile, Lys, Phe, Thr, Val e Leu

Aminoácido	Temperatura de Demolha	Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação
His	+ económico	+ económico	48 h
Ile	+ económico	+ económico	48 h
Lys	+ económico	+ económico	48 h
Phe	+ económico	+ económico	48 h
Thr	+ económico	+ económico	48 h
Val	+ económico	+ económico	48 h
Leu	+ económico	+ económico	48 h

Met

No caso da metionina, uma vez que tanto os fatores como a interação são significativos, prevalece a interação. Para a temperatura de demolha, não sendo fator significativo, considerar-se-á o nível mais económico que, estará, como já foi dito dependente de condições ambiente. De forma a determinar a melhor combinação de níveis, somaram-se as respostas para todas as combinações possíveis destes fatores.

Tabela 4.18 - Identificação da melhor combinação de níveis para a metionina

Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação	Soma Respostas
-1 (18 °C)	-1 (24 h)	667.2
0 (23 °C)	-1 (24 h)	570.1
+1 (28 °C)	-1 (24 h)	666.0
-1 (18 °C)	0 (48 h)	920.0
0 (23 °C)	0 (48 h)	939.5
+1 (28 °C)	0 (48 h)	928.4
-1 (18 °C)	+1 (72 h)	1014.2
0 (23 °C)	+1 (72 h)	762.9
+1 (28 °C)	+1 (72 h)	926.9

Observa-se, então, que os níveis para os quais se obtém respostas mais elevadas são o nível - 1 para a temperatura de germinação, correspondente a uma temperatura de 18 °C e +1 para o tempo de germinação, sendo este de 72 h.

Tabela 4.19 - Melhor combinação de níveis para a metionina

Temperatura de Demolha	Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação
+ económico	18 °C	72 h

Melhor Combinação de níveis

Uma vez determinada a melhor combinação de níveis para cada uma das características analisadas, expuseram-se os resultados obtidos na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Resumo da melhor combinação de níveis para as características analisadas

	Temperatura de Demolha (°C)	Temperatura de Germinação (°C)	Tempo de Germinação (h)
Proteína Total	30	TA*	24
Soma AA	TA*	TA*	24
His	TA*	TA*	48
Ile	TA*	TA*	48
Leu	TA*	TA*	48
Lys	TA*	TA*	48
Met	TA*	18	72
Phe	TA*	TA*	48
Thr	TA*	TA*	48
Val	TA*	TA*	48

*TA: temperatura ambiente (que poderá corresponder tanto a 20 °C ou 30 °C para a demolha ou a 18, 23 ou 28 °C no caso da germinação)

4.5.2 Análise dos pressupostos da ANOVA

Tal como já foi referido, analisaram-se os pressupostos da análise da variância a fim de validar os pressupostos assumidos para o Desenho de Experiências. Em primeiro lugar e de forma a assegurar a homogeneidade da variância e a normalidade dos dados, investigou-se a necessidade de transformar os dados obtidos através do método da transformação de Box-Cox.

De seguida, representaram-se graficamente os resíduos normalizados, de forma a validar o pressuposto da normalidade e por fim, avaliou-se a homogeneidade da variância, representando graficamente os resíduos em função dos valores previstos. O pressuposto da independência não será alvo de investigação, uma vez que as experiências não foram realizadas de forma aleatória.

A título de exemplo, demonstrar-se-á a análise de cada um dos pressupostos já referidos para a Proteína Total. As restantes análises encontram-se no Anexo V e as respetivas interpretações representadas na Tabela 4.22.

Proteína Total

Método da Transformação de Box-Cox

Este método consiste na transformação de dados de acordo com vários valores de λ e na análise da variância dos dados transformados. Considera-se a melhor estimativa de λ aquela que corresponde ao valor para o qual a Variação Residual é mínima. De seguida, determina-se o intervalo de confiança para o parâmetro de transformação e traça-se o mesmo no gráfico da Variação Residual em função de λ . Se $\lambda=1$ estiver contido neste intervalo de confiança, não é necessário transformar os dados.

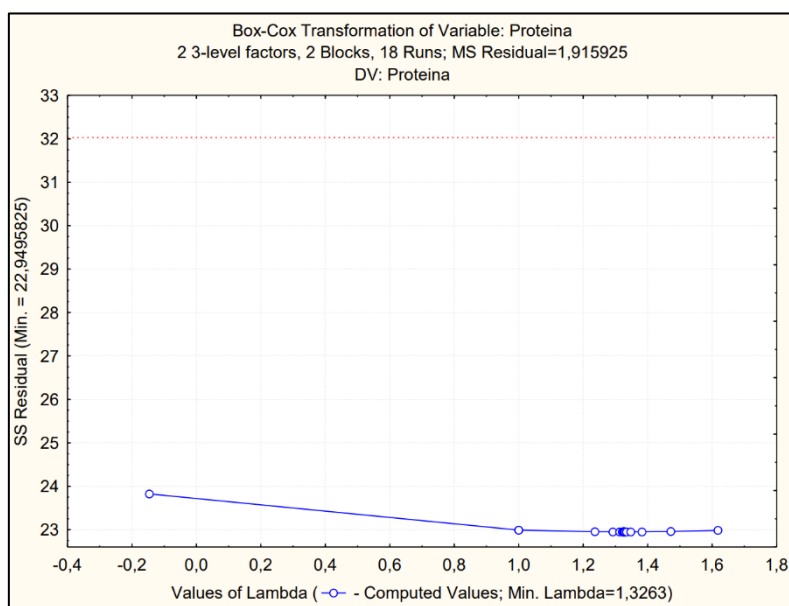


Figura 4.4 - Verificação de Box-Cox para a proteína total

Observando a figura 4.4, confirma-se que a unidade ($\lambda=1$) está contida no intervalo de confiança, não existindo, assim, necessidade de transformar os dados.

Normalidade

Pela observação do gráfico de probabilidades da distribuição Normal, verifica-se que os resíduos se dispõem aproximadamente em linha reta e portanto, este pressuposto estará razoavelmente satisfeito.

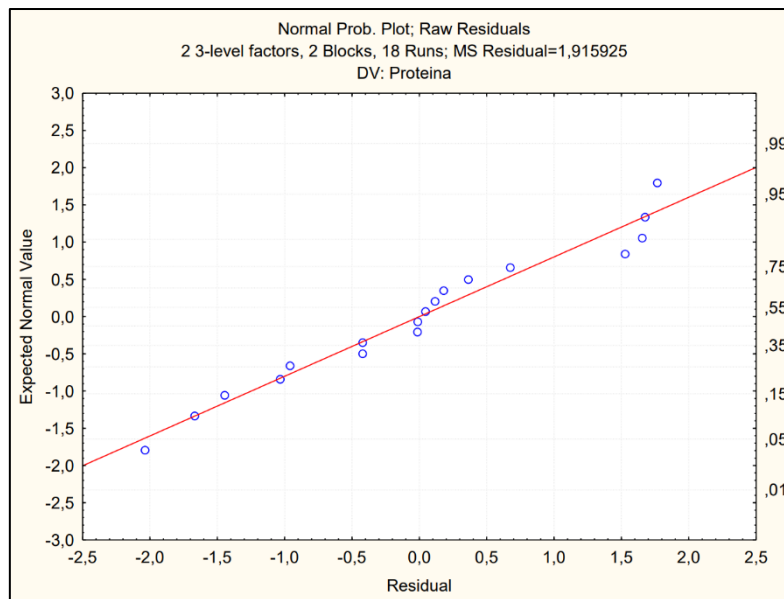


Figura 4.5 - Verificação da normalidade para a metionina (Valores expectáveis normalizados vs resíduos)

Variância

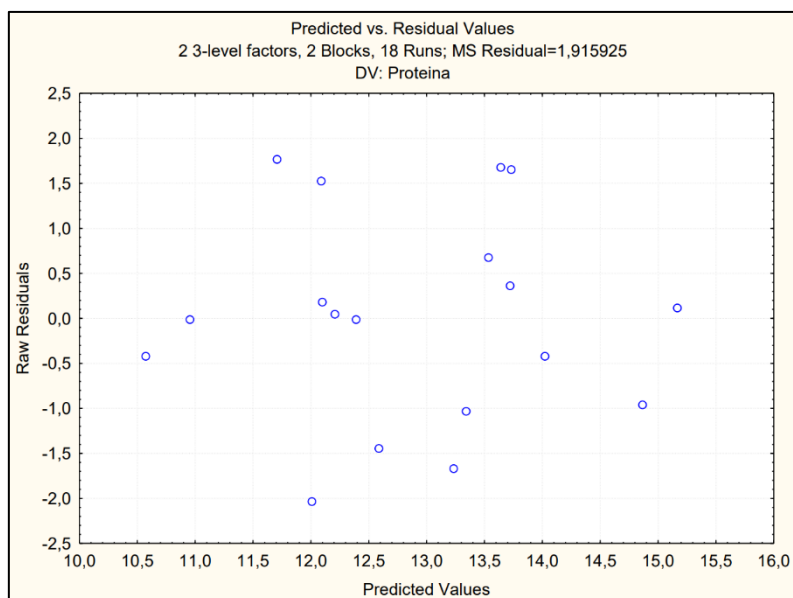


Figura 4.6 - Verificação da homogeneidade da variância (Valores previstos vs resíduos)

O gráfico dos resíduos em função dos valores previstos não apresenta nenhuma estrutura especial e, portanto, não existirá à partida uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância.

Resumo da verificação dos pressupostos

Na Tabela 4.21, encontram-se resumidas as conclusões retiradas sobre os pressupostos da análise da variância para cada uma das características avaliadas. Todos os gráficos e dados utilizados para a realização da mesma encontram-se no Anexo V.

Tabela 4.21 - Resumo da verificação dos pressupostos para as características analisadas

	Box-Cox	Normalidade	Variância
Proteína Total	✓	✓	✓
Soma AA	✓	✓	✓
His	✓	✓	✓
Ile	✓	✓	✓
Leu	✓	✓	✓
Lys	✓	✓	✓
Met	✓	✓	✓
Phe	✓	✓	✓
Thr	✓	✓	✓
Val	✓	✓	✓

4.6 Análise microbiológica

Após as fases de demolha e germinação, sendo que estas se dão com uma temperatura relativamente alta e uma humidade bastante elevada, é então necessário averiguar se o trigo sarraceno ainda se encontra próprio para consumo.

Com este fim, realizaram-se análises microbiológicas ao grão, verificando se a quantidade de microrganismos observada é aceitável, tendo em conta os critérios mencionados no capítulo 2. Os resultados obtidos encontram-se expressos na Tabela 4.22.

Verifica-se que todas as amostras se encontram dentro do critério “Aceitável” e, portanto, a qualidade do produto está, assim, assegurada. É também facilmente perceptível, por observação direta, que a demolha a uma temperatura de 30 °C é mais favorável ao crescimento de microrganismos do que a 20 °C.

Tabela 4.22 – Quantidade de microrganismos das amostras retiradas ao longo das 72h

Temperatura de germinação (°C)	Duração da germinação (h)	Demolha a 20°C (microrganismos/mL)	Demolha a 30°C (microrganismos/mL)
18	24	6 E +01	1 E +03
	48	4 E +02	2 E +03
	72	7 E +02	3 E +03
23	24	1 E +02	5 E +01
	48	4 E +02	2 E +03
	72	1 E +04	7 E +04
28	24	5 E +01	5 E +02
	48	2 E +03	3 E +03
	72	1 E +04	3 E +04

Demolha 20 °C

De seguida, tomando por base a temperatura de demolha, observou-se, graficamente, figura 4.7, a evolução ao longo do tempo para cada temperatura de germinação.

A uma demolha de 20 °C, facilmente se percebe que para germinações com maior duração, a concentração de microrganismos é superior. Comparando as diferentes temperaturas de germinação, apenas é perceptível que, numa primeira observação, uma germinação a 18 °C é menos propícia ao crescimento microbiano. A temperaturas mais elevadas, 23 °C e 28 °C não é possível tirar conclusões por observação direta.

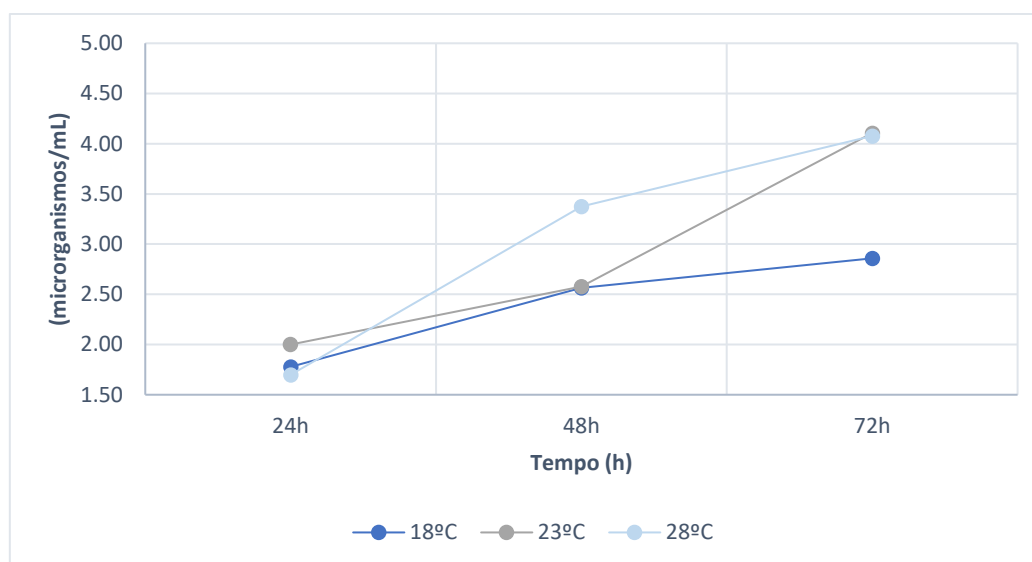


Figura 4.7 - Evolução do número de microrganismos a uma demolha de 20 °C

Demolha 30 °C

A uma demolha de 30 °C, figura 4.8, apesar do crescimento microbiano ser bastante mais notório a uma temperatura de 23 °C, o mesmo não acontece com as restantes temperaturas. Para uma temperatura de germinação de 18 °C, a variação ao longo do tempo é pouco notória e para os 28 °C apesar de um pouco mais discrepante, ainda apresenta uma janela inferior ao dos 23 °C.

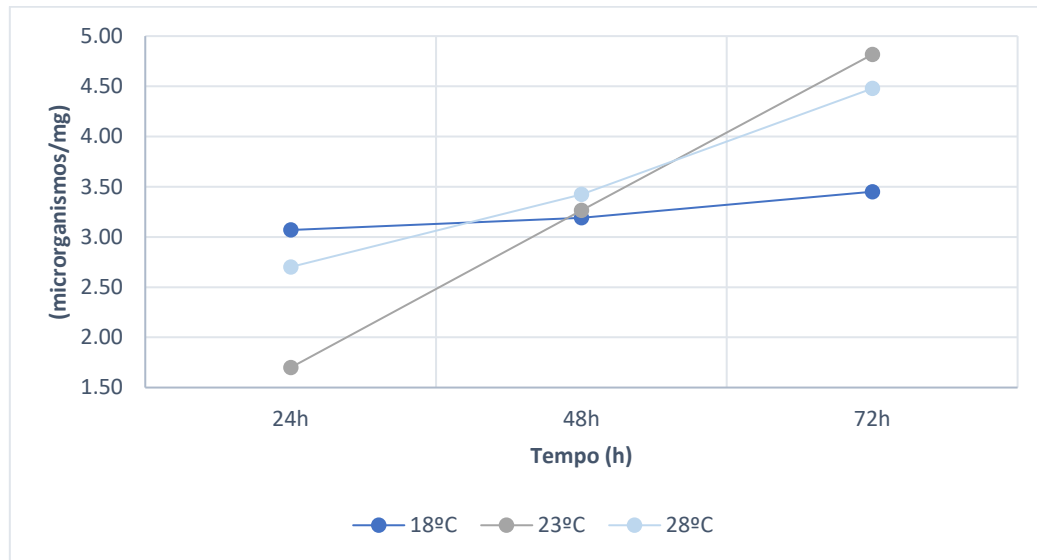


Figura 4.8 - Evolução do número de microrganismos a uma demolha de 30°C

A diferença entre as temperaturas de demolha é notória quando se compara o esboço gráfico de ambas, verificando-se um maior número de microrganismos para uma temperatura de 30 °C, tal como já tinha sido referido anteriormente.

5. Conclusões e recomendações para trabalhos futuros

5.1 Conclusões

O foco ao longo da presente dissertação foi aplicar métodos estatísticos, nomeadamente o desenho de experiências (fatorial 3^2 completo), no processo de maltagem do TS, para determinar as melhores condições para obter um teor de proteína/concentração de aminoácidos essenciais mais elevado. Os fatores escolhidos para análise estatística, temperatura de demolha, tempo e temperatura de germinação foram eleitos após revisão bibliográfica, de onde se concluiu que estes seriam os que mais influenciavam todo o procedimento.

O processo de maltagem foi realizado de modo a que o processo se possa repercutir num ambiente mais descontraído (em casa, por exemplo), sendo este acessível a qualquer um que queira incorporar este pseudocereal na sua alimentação, particularmente em Portugal, onde as temperaturas ambiente são semelhantes às aplicadas durante todo o processo. Também as temperaturas de maltagem são facilmente atingidas com a utilização de um forno de cozinha. O procedimento laboratorial, como a determinação do teor de humidade, método Kjeldahl e quantificação de aminoácidos, foi executado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, o laboratório nacional de referência, maioritariamente no Departamento de Alimentação e Nutrição, com exceção da análise microbiológica para controlo de qualidade que se efetuou no Laboratório de Microbiologia do Instituto.

A primeira fase consistiu em pré-experiências para determinar os tempos de demolha e de secagem. Arbitrando como valores de temperatura de demolha 20 °C e 30 °C, foi necessário, para cada uma delas, determinar o tempo necessário para atingir uma humidade de 50%. Apesar de se terem recolhido amostras durante 24 h, o objetivo foi atingido ao fim de duas horas para ambas as situações e, foi este o tempo utilizado nas experiências precedentes.

Tabela 5.1 - Temperaturas e tempo de demolha utilizados ao longo do estudo

Temperatura (°C)	Tempo (h)
20	2
30	2

Quanto à temperatura de secagem, e uma vez que esta fase apenas se dá para terminar os processos metabólicos, preservar as características adquiridas durante a germinação e dar cor e aroma ao grão, optou-se por uma temperatura utilizada em estudos prévios (70 °C) e determinou-se o tempo necessário até à obtenção de um teor de humidade inferior a 10%. Também nesta situação se retiraram amostras a diferentes tempos (4 h, 5 h e 6 h), mas na primeira amostragem (4 h após colocar o grão na estufa) todas as amostras já tinham atingindo o teor de humidade desejado e, portanto, foi este o tempo utilizado nas experiências seguintes.

Tabela 5.2 - Tempo e temperatura de secagem utilizados ao longo do estudo

Temperatura (°C)	Tempo (h)
70	4

Antes da aplicação de métodos estatísticos, procedeu-se ainda à comparação de certos parâmetros. Uma vez que a Proteína Total foi, ao longo deste estudo, determinada de duas formas diferentes, pelo método Kjeldahl e pela soma dos aminoácidos é importante comparar os valores obtidos. No entanto, a maior parte destes difere bastante, o que como já foi referido dever-se-á à incerteza de ambos os métodos e perdas e contaminações que poderão ter ocorrido no decorrer das experiências. Para contornar estes fatores, recomendar-se-ia várias repetições da medição da proteína, assim como das quantidades de aminoácidos, ou até a repetição do procedimento desde o início.

Quando comparadas as quantidades de AAE, no TS cru e maltado, apesar das diferenças à primeira vista também não parecerem relevantes, observa-se uma concentração maior principalmente de Lisina e Leucina para o TS maltado. Uma vez que leucina é o AA limitante na maior parte dos cereais, TS maltado poderá ser uma boa opção, para combater a deficiência do mesmo. No entanto, é preciso ter em conta que os valores do grão maltado correspondem a uma média de todas as maltagens realizadas, que apresentam coeficientes de variação elevados e, por isso, seriam necessárias mais medições/experiências para assegurar a precisão dos valores obtidos.

Procedeu-se, de seguida, à análise da variância, de onde se concluiu que, para a Proteína Total, o único efeito considerado significativo é a temperatura de demolha, o que já era de esperar tendo em conta a primeira análise efetuada no capítulo 4.3. Para corroborar este resultado, procedeu-se à análise da variância separadamente, isto é, sem blocos. Mais uma vez nenhum efeito foi considerado significativo e, portanto, confirma-se o primeiro resultado obtido. Para os restantes efeitos consideraram-se os níveis mais económicos, uma vez que não têm impacto significativo no resultado final. Nas situações em que a temperatura não foi considerada significativa, não se assumiu nenhum nível como mais económico, uma vez que a rentabilidade dependerá das condições ambientes na altura da germinação e poderá ser qualquer um dos admitidos.

Para a Proteína, enquanto soma dos aminoácidos, nenhum efeito foi considerado significativo e portanto, a melhor combinação de níveis corresponde ao nível mais económico para todos os efeitos. Quanto à His, Ile, Lys, Phe, Thr, Leu e Val obtiveram-se os mesmos resultados para todos estes AA, concluindo-se que apenas o tempo de germinação é significativo e que se obtém valores mais elevados quando se germina o grão por 48h. Por fim e contrariando os restantes aminoácidos, no caso da metionina, tanto a temperatura como o tempo de germinação se revelaram significativos, com melhores resultados a uma temperatura de germinação de 18°C e tempo de 72h.

Tabela 5.3 - Melhor combinação de níveis

Temperatura de Demolha	Temperatura de Germinação	Tempo de Germinação
30 °C	18 °C	48 h

Conclui-se, assim, que a combinação de níveis a utilizar dependerá das necessidades de cada um, sendo que a combinação acima será desejável, uma vez que combina os efeitos significativos de cada uma das características analisadas. É ainda de referir que estas conclusões apenas se aplicam aos intervalos de tempo/temperaturas considerados. A validação dos pressupostos da análise da variância é essencial para validar a análise efetuada, uma vez que poderá ser necessário transformar os dados para a aplicação do DOE. Devido ao modo como é realizado o procedimento, isto é, demolha-germinação-maltagem e visto que se demolha a duas temperaturas diferentes, que depois se germinam a 3 temperaturas diferentes, realizar as experiências de forma aleatória consumiria demasiado tempo e recursos do laboratório, assim como também o desperdício seria maior. Posto isto, o pressuposto da independência não se verifica. Os pressupostos da normalidade e variância não parecem apresentar violações, com exceção da normalidade para os casos dos aminoácidos Ile, Leu e Val nos quais se observam 2 comportamentos diferentes na representação gráfica que, no entanto, se podem dever aos 2 blocos diferentes (temperaturas de demolha) nos quais os dados estão repartidos. Analisou-se ainda, através do método de Box-Cox, se existiria a necessidade de transformar os dados, mas estando $\lambda=1$ incluído no intervalo de confiança, concluiu-se que não seria, então, necessário.

Relativamente à análise microbiológica, não foram encontradas restrições no que diz respeito aos tempos e temperaturas de demolha e germinação realizadas, uma vez que todas as amostras se encontravam dentro do critério aceitável.

5.2 Recomendações

Durante o procedimento prático, nem sempre foi fácil compreender que níveis utilizar para as características analisadas ou mesmo se os tempos utilizados fariam sentido, pelo que se sugeria a realização de mais pré-experiências, com amostras em intervalos de tempo mais curtos. Relativamente às temperaturas a utilizar, também seria conveniente abranger temperaturas mais baixas, para que o processamento também possa ser adaptado a outras estações/países mais frios.

Estando a procura por alimentos saudáveis a aumentar nos últimos anos, assim como a preocupação por um estilo de vida mais cuidado, seria interessante aplicar o DOE na maltagem de outros cereais ou pseudocereais, como o amaranto e a quinoa e ainda aplicar o mesmo em trigo sarraceno Tartárico, de modo a estabelecer a comparação entre os teores proteicos de ambos e os seus comportamentos durante a maltagem.

Sugere-se, ainda, na aplicação do DOE, a utilização de réplicas puras, isto é, repetir o procedimento desde o início, para que se possa repartir o erro em *pure error* e *lack of fit*, reduzindo, assim, o erro experimental.

6. Bibliografia

- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014>
- Amelchanka, S. L., Kreuzer, M., & Leiber, F. (2010). Utility of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) as feed: Effects of forage and grain on in vitro ruminal fermentation and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 155(2–4), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.10.007>
- Berghofer, E., & Schoenlechner, R. (2007). Pseudocereals - An Overview. *International Foundation for Science, Traditional Grains for Low Environmental Impact and Good Health, University of Pretoria, IFS Workshop: Traditional Grains for Low Environmental Impact and Good Health*.
- Bonafaccia, G., & Fabjan, N. (2003). Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo*, 81(2), 349–355.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>
- Campbell, C. (1997). *Buckwheat. Fagopyrum esculentum Moench*.
- Chand, N., & Mihas, A. a. (2006). Celiac Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(1), 3–14. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000190644.01661.2b>
- Christa, K., & Soral-Šmietana, M. (2008). Buckwheat grains and buckwheat products - Nutritional and prophylactic value of their components - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(3), 153–162.
- Dietrych-Szostak, D., & Oleszek, W. (1999). Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4384–4387. <https://doi.org/10.1021/jf990121m>
- Fletcher, R. J. (2016). *Pseudocereals, Overview. Reference Module in Food Science* (2nd ed., Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00039-1>
- Gahlawat, P., & Sehgal, S. (1994). In vitro starch and protein digestibility and iron availability in weaning foods as affected by processing methods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(2), 165–173. <https://doi.org/10.1007/BF01088474>
- Giménez-Bastida, J. A., Piskula, M. K., & Zieliński, H. (2015). Recent advances in processing and development of Buckwheat derived bakery and non-bakery products - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(1), 9–20. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0005>
- Giménez-Bastida, J. A., Piskula, M., & Zieliński, H. (2015). Recent advances in development of gluten-free buckwheat products. *Trends in Food Science and Technology*, 44(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.013>
- Giménez-Bastida, J. A., & Zieliński, H. (2015). Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7896–7913. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02498>

- González-Sarrías, A., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2013). Nutraceuticals for older people: Facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*, 75(4), 313–334. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.05.006>
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M., & Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 886–891. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1120>
- Guo, X. D., Ma, Y. J., Parry, J., Gao, J. M., Yu, L. L., & Wang, M. (2011). Phenolics content and antioxidant activity of tartary buckwheat from different locations. *Molecules*, 16(12), 9850–9867. <https://doi.org/10.3390/molecules16129850>
- Hager, A. S., Mäkinen, O. E., & Arendt, E. K. (2014). Amylolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa. *European Food Research and Technology*, 239(4), 621–627. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2258-0>
- Hotz, C., & Gibson, R. S. (2018). Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets 1, (May), 1097–1100.
- Hübner, F., & Arendt, E. K. (2013). Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 853–861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.562060>
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J. A., & Briggs, C. J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40(3), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.009>
- Jnawali, P., Kumar, V., & Tanwar, B. (2016). Celiac disease: Overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.09.003>
- Kaukovirta-Norja, A., Wilhelmson, A., & Poutanen, K. (2004). Germination: A means to improve the functionality of oat. *Agricultural and Food Science*, 13(1–2), 100–112. <https://doi.org/10.2137/1239099041838049>
- Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S. A., & Khattak, M. S. (2007). Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry*, 104(3), 1074–1079. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.022>
- Kinsey, L., Burden, S. T., & Bannerman, E. (2008). A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(11), 1333–1342. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602856>
- Klose, C., Schehl, B. D., & Arendt, E. K. (2009). Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.014>
- Kreft, I. (2001). Buckwheat Research , Past , Present and Future Perspectives- 20 Years of Internationally Coordinated Research, 366(July), 361–366.
- Li, S., & Zhang, Q. H. (2001). Advances in the Development of Functional Foods from Buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(6), 451–464. <https://doi.org/10.1080/20014091091887>
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2013). Germination of Oat and Quinoa and Evaluation of the Malts as Gluten Free Baking Ingredients. *Plant Foods for Human*

- Nutrition*, 68(1), 90–95. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0335-3>
- Malalgoda, M., & Simsek, S. (2017). Celiac disease and cereal proteins. *Food Hydrocolloids*, 68, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.024>
- Mann, S., Gupta, D., & Gupta, R. K. (2012). Evaluation of nutritional and antioxidant potential of Indian buckwheat grains. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 11(1), 40–44.
- Mejías, J. H., Lu, X., Osorio, C., Ullman, J. L., von Wettstein, D., & Rustgi, S. (2014). Analysis of wheat prolamins, the causative agents of celiac sprue, using reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Nutrients*, 6(4), 1578–1597. <https://doi.org/10.3390/nu6041578>
- Mota, C. (2015). Pseudocereais como Ingredientes de Formulações Destinadas a uma Alimentação Especial, 119(3), 859–867.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A. S., Torres, D., & Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.043>
- Motta, C., Delgado, I., Matos, A. S., Gonzales, G. B., Torres, D., Santos, M., ... Castanheira, I. (2017). Foliates in quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus* sp.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*): Influence of cooking and malting. *Journal of Food Composition and Analysis*, 64(August), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.09.003>
- Norton, L. E., & Layman, D. K. (2006). Leucine Regulates Translation Initiation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle after Exercise. *The Journal of Nutrition*, 136(2), 533S–537S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.2.533S>
- Ohnishi, O. (1980). On the Origin of Cultivated Buckwheat. *Biological Journal of the Linnean Society*, 13(4), 299–313. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1980.tb00089.x>
- Ohnishi, O. (1991). Discovery of the wild ancestor of common buckwheat. *Fagopyrum*, 11, 5–10.
- Pang, G., Xie, J., Chen, Q., & Hu, Z. (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 26–60. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.10.001>
- Patricia, B., Phiarais, N., Wijngaard, H. H., Arendt, E. K., & Brew, J. I. (2005). The Impact of Kilning on Enzymatic Activity of Buckwheat Malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(3), 290–298. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00685.x>
- Paucar-Menacho, L. M., Peñas, E., Dueñas, M., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.038>
- Pavek, P. L. S. (2016). *Fagopyrum esculentum* Moench Plant Symbol = FAES2. *Plant Guide for Buckwheat (Fagopyrum Esculentum)*. USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman Plant Materials Center. Pullman, WA.
- Phiarais, B. P. N., Wijngaard, H. H., Arendt, E. K., Nic, B. P., Wijngaard, H. H., Kilning, E. K. A., ... Unit, B. T. (2006). The Science of Beer Kilning Conditions for the Optimization of Enzyme Levels in Buckwheat Kilning Conditions for the Optimization, 0470. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0187>
- Platel, K., Eipeson, S. W., & Srinivasan, K. (2010). Bioaccessible mineral content of malted

- finger millet (*Eleusine coracana*), wheat (*Triticum aestivum*), and barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8100–8103. <https://doi.org/10.1021/jf100846e>
- Pomeranz Yeshajahu, R. G. (1959). Amino Acid Composition of Buckwheat. *Protein and Amino Acid Nutrition*, 20(2), 281. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.11.013>
- Robinson, R. G. (2016). The Buckwheat Crop in Minnesota. *Agricultural Experiment Station, University of Minnesota*.
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C. P., Calderwood, A. H., & Murray, J. A. (2013). ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 108(5), 656–676. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.79>
- Saturni, L., Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2010). The gluten-free diet: Safety and nutritional quality. *Nutrients*, 2(1), 16–34. <https://doi.org/10.3390/nu2010016>
- See, J., & Murray, J. A. (2006). Gluten-free diet: The medical and nutrition management of celiac disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1177/011542650602100101>
- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Schuster, R. L., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., & Obendorf, R. L. (2000). Fagopyritols, D-chiro-inositol, other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2843–2847. <https://doi.org/10.1021/jf990709t>
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R. (2012). The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *Journal of Cereal Science*, 55(2), 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.013>
- Terpinc, P., Cigic, B., Polak, T., Hribar, J., & Pozrl, T. (2016). LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry*, 210, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.030>
- Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Yokoyama, F., Nakajoh, M., & Kato, N. (2000). A Buckwheat Protein Product Suppresses Gallstone Formation and Plasma Cholesterol More Strongly than Soy Protein Isolate in Hamsters. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1670–1674. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1670>
- Vachirapatama, N., Chamnankid, B., & Kachonpadungkitti, Y. (2011). Determination of rutin in buckwheat tea and Fagopyrum tataricum seeds by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(4), 463–469.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., & Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.05.002>
- Wijngaard, H. H., Ulmer, H. M., & Arendt, E. K. (2006). The Effect of Germination Time on the Final Malt Quality of Buckwheat. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64(4), 214–221. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00683.x>
- Wijngaard, H. H., Ulmer, H. M., Arendt, E. K. (2005). The Effect of Germination Temperature on Malt Quality of Buckwheat. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-63-0031>
- Wijngaard, H. H., Ulmer, H. M., Neumann, M., & Arendt, E. K. (2005). The effect of steeping time on the final malt quality of buckwheat. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(3), 275–281. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00683.x>
- Yan, C., & Zongwen, Z. (2007). *Advances in Buckwheat. Proceedings of the 10th international*

symposium on buckwheat.

- Young, V. R., & Borgonha, S. (2000). Criteria and Significance of Dietary Protein Sources in Humans Nitrogen and Amino Acid Requirements : The Massachusetts Institute of Technology Amino Acid. *The Journal of Nutrition*, 130(May), 1841–1849. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.04.215>
- Zarnkow, M., Geyer, T., Lindemann, B., Burberg, F., Back, W., Arendt, E. K., & Kreisz, S. (2007). The Use of Response Surface Methodology to Optimise Malting Conditions of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) as a Raw Material for Gluten-Free Foods. *Journal of the Institute of Brewing*, 60(9–10), 118–126.
- Zhang, Z. L., Zhou, M. L., Tang, Y., Li, F. L., Tang, Y. X., Shao, J. R., ... Wu, Y. M. (2012). Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Research International*, 49(1), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.035>
- Zhu, F. (2016). Buckwheat starch: Structures, properties, and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.002>
- Zielińska, D., Szawara-nowak, D., & Zieliński, H. (2010). Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(4), 315–321. <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i12.12454>

7. Anexos

Anexo I – Protocolo experimental para a determinação do teor de humidade

Reagentes

Usar apenas reagentes de qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a norma ISO 3696.

- **Areia** tratada.
- **Sílica gel** ou outra substância com indicador de humidade.

Aparelhos e utensílios

- **Cápsulas de metal** (ex. níquel, alumínio, aço inoxidável) com tampa, com um diâmetro de pelo menos 60 mm e uma altura de pelo menos 20 mm.
- **Balança analítica** com resolução de 0,0001 g.
- **Pipeta volumétrica** de 5 mL.
- **Vareta de vidro** com comprimento aproximadamente igual ao diâmetro da cápsula de metal.
- **Banho de água** fervente.
- **Estufa de secagem**, regulável a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- **Estufa de secagem**, com pressão reduzida, regulável a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- **Moinho / homogeneizador** de laboratório.
- **Banho de ultra-sons**.
- **Exsicador**, com sílica ou outra substância exsicante equivalente.
- **Liofilizador**.

Preparação da amostra

- Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.
- Quando necessário recorrer à liofilização da amostra.
- No caso de amostras líquidas gaseificadas, proceder à eliminação do gás em banho de ultra-sons.

Técnica

- As pesagens são efetuadas ao decimilograma.
- Efetuar o ensaio em duplicado (X_1 e X_2).

Preparação das cápsulas

- Colocar a cápsula e respetiva tampa dentro da estufa durante 1 hora a 102°C;
- Cobrir a cápsula com a respetiva tampa, retirar da estufa, colocar no exsiccador, deixar arrefecer até atingir a temperatura ambiente e pesar.

Toma de amostra

- Pesar 5g de amostra.

Secagem

- Colocar as cápsulas contendo a amostra na estufa, durante 2h.
- Retirar da estufa, deixar arrefecer em exsiccador até atingir a temperatura ambiente e pesar.
- Repetir os passos de secagem (1h), arrefecimento e pesagem até obtenção de peso constante.

Resultados

O teor de água / humidade, expresso em gramas por 100 g é:

$$\frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0) \text{ ou } v} \times 100$$

Sendo:

m_0 a massa, em gramas, da cápsula de metal (ou da cápsula com a areia e a vareta de vidro);

m_1 a massa, em gramas, da cápsula de metal (ou da cápsula com a areia e a vareta de vidro) com a amostra;

m_2 a massa, em gramas, da cápsula de metal (ou da cápsula com a areia e a vareta de vidro) com a amostra após secagem (peso constante);

v o volume, em mililitros, da toma de amostra.

Anexo II – Protocolo experimental para aplicação do método Kjeldahl

Reagentes

Usar apenas reagentes de qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a Norma ISO 3696.

- **Ácido sulfúrico 95-98% concentrado** (H_2SO_4 , $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/cm}^3$).
- **Mistura catalisadora.** Disponível no comércio sob a forma de pastilhas com a seguinte composição: 3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- **Solução de ácido bórico, a 4% (m/v).** Pesar 40 g de ácido bórico, adicionar H_2O e transferir para um balão de 1L. Completar o volume. Medir o pH e registrar.
- **Solução de hidróxido de sódio a 40% (m/m ou m/v).**
- **Solução de HCl 0,1N ou H_2SO_4 0,1N.**
- **Triptofano (98,5%)** ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) (PM 204,2 g/mol) **ou hidrocloreto de lisina** ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$) (PM 182,65 g/mol).
- **Sulfato de amônio (99,5%)** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PM 132,13 g/mol).
- **Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, 2% (m/v).** Pesar 6,0800 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (previamente seco em estufa elétrica a 100°C durante 4 horas), adicionar H_2O e transferir para um balão de 500 mL. Completar o volume. Guardar no frigorífico (2°C - 8°C).
- **Soluções padrão** de pH 4,0 e 7,0.

Aparelhos e utensílios

- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Equipamento Tecator Kjeltec.
- Balões volumétricos.
- Titulador automático “Titrand 808-Metrohm” ou sistema equivalente.
- Frascos de Erlenmeyer de 300 mL.
- Pipeta de 5 mL, calibrada.
- Tubos de digestão de 250 mL.
- Estufa elétrica regulada a 102°C \pm 2°C.

Preparação da Amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra.

No caso de amostras líquidas gaseificadas, proceder à eliminação do gás em banho de ultra-sons.

Toma de amostra

Pesar 1g de amostra.

Técnica

- As pesagens são efetuadas ao decimilograma.
- Efetuar duas determinações paralelas.
- Efetuar um ensaio de recuperação de padrão usando cerca de 0,1 g de triptofano (ou de cloreto de lisina) e cerca de $\frac{1}{2}$ da toma de amostra utilizada no ensaio (0,5g). Deve recuperar-se pelo menos 95% de azoto.
- Antes da destilação das amostras efetuar um ensaio em branco da destilação e um ensaio controlo da destilação. O volume de solução de ácido gasto na titulação do branco não deve ser superior a 0,30 mL e deve recuperar-se pelo menos 98% de azoto no ensaio controlo da destilação.

1. Mineralização

- Pesar a amostra (medir o volume quando aplicável) com a precisão de 0,0001 g.
- Lavar as paredes dos tubos de Kjeldahl com um pouco de H₂O.
- Adicionar duas pastilhas de mistura catalisadora.
- Adicionar cuidadosamente, junto às paredes internas do tubo de Kjeldahl, 15mL de H₂SO₄ concentrado e misturar suavemente.
- Colocar os tubos a mineralizar na Unidade Digestão.

2. Destilação

- Ligar a Unidade de Destilação do Sistema Tecator Kjeltect.
- Efetuar o ciclo de limpeza diário, selecionando o Programa P2. Este ciclo é repetido pelo menos 3 vezes antes de se iniciar a destilação do branco e das amostras.
- Iniciar a destilação do branco, das amostras, do padrão e do sulfato de amónio, selecionando o Programa P1 (ver DAN URQ-IT14 – Ciclo de destilação).
- Efetuar a destilação do branco (branco de destilação): medir 10 mL de H₂SO₄ para um tubo de Kjeldahl e destilar conforme Programa 1. Terminada a destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado.
- Efetuar a destilação da solução de sulfato de amónio: medir 10 mL de H₂SO₄ e 10 mL da solução de sulfato de amónio (5.2.8) para um tubo de Kjeldahl e destilar conforme

Programa 1. Terminada a destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado.

- Seguidamente, destilar as amostras conforme Programa 1. Terminada cada destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contato com o destilado.

3. Titulação

- Titular o branco, as amostras, o padrão e o sulfato de amónio com solução de ácido 0,1N (5.2.5) até ao ponto de pH $4,4 \pm 0,1$, medido por potenciómetro.
- Terminado o ensaio eliminar os resíduos de acordo com o procedimento DAN-PE02 e passar o material sujo por água da torneira para depois ser lavado.

Resultados

O teor de azoto total da amostra, expresso em percentagem, é:

$$\frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m \text{ ou } v}$$

Sendo:

V_1 o volume, em mililitros, da solução de ácido 0,1 N gasto na titulação da amostra;

V_0 o volume, em mililitro da solução de ácido 0,1 N gasto na titulação do branco de destilação;

m a massa, em gramas, da toma de amostra;

v o volume, em mililitros, da toma de amostra.

O teor de proteína total obtém-se multiplicando a percentagem de azoto pelo fator 5,7 para cereais, 6,38 para leites e produtos lácteos e 6,25 para os restantes produtos.

Anexo III – Protocolo experimental para a quantificação dos aminoácidos

Reagentes

- Kit AccQ-Tag Chemistry Kit que inclui: Waters Amino Acid Hydrolysate standard; Waters AccQ Flúor Borate Buffer; Waters AccQ Flúor Reagent Powder; Waters AccQ Flúor Reagent Diluent; AccQ-Tag Ultra Eluente A; AccQ-Tag Ultra Eluente B.
- D-Norvalina - 99% grau de pureza (CAS Nº: 2013-12-9)
- Acetonitrilo para HPLC grau de gradiente, (CAS Nº: 75-05-8)
- Ácido clorídrico fumante 37%, (p.a.) (CAS Nº: 7647-01-0) HCL 6N – 501,1mL/1L
- Fenol puro (Cristalino) (CAS Nº: 108-95-2)
- Hidróxido de Sódio lentilhas, p.a. (CAS. Nº: 1310-73-2) NaOH 6N – 240 g / 1L
- Água Ultra Pura – Milli-Q (18-megaohm)

Preparação da solução de padrão interno de D-Norvalina para a hidrólise

- Preparar uma solução com uma concentração de 25mM.
 1. Pesar 29,5 mg de NVal.
 2. Pôr a NVal num balão volumétrico certificado de 10 mL e preencher o volume com HCl 0,1 N.
 3. Armazenar esta solução em pequenas aliquotas no congelador.

Hidrólise ácida em microondas

Esta foi realizada no microondas, modelo Ethos 1 da marca Milestone.

1. Pesar entre 20 a 50 mg de amostra para um vial de hidrólise.
2. Adicionar 100 µL ou 200 µL de solução de padrão interno de NVal ao vial, se amostra for retomada, respetivamente, para um balão de 5mL ou de 10mL.
3. Adicionar a cada vial 1 mL de uma solução de HCl 6 N com 0,5% de fenol.
4. Pôr 30 mL de HCl 6 N no copo do rotor do microondas e colocar a rack dos vials lá dentro.
5. Colocar o rotor no microondas e selecionar o programa (15 minutos para atingir os 160°C, 10 minutos a 160°C e 30 min. de arrefecimento).
6. Fazer 3 purgas ao rotor do seguinte modo:
 - a. Abrir a válvula de vácuo e a válvula de azoto durante 2 min;
 - b. Fechar a válvula de azoto e esperar mais 2 min;
 - c. Repetir os passos a. e b. mais duas vezes.

7. Iniciar o programa do microondas.
8. Após a conclusão da hidrólise retirar as amostras do microondas e neutralizar a hidrólise com 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 6 N.
9. Retomar o conteúdo de cada vial para um balão volumétrico. Lavar o vial até completa remoção dos resíduos com a ajuda de um vortex e perfazer o restante volume com água ultra pura.
10. Filtrar conteúdo do balão para um tudo de vidro com tampa.

Preparação da solução de padrão interno de D-Norvalina para a curva de calibração

- Preparar uma solução com uma concentração de 2,5 mM.
 1. Pesar 2,95 mg de NVal.
 2. Colocar a NVal num balão volumétrico certificado de 10 mL e perfazer o volume com HCl 0,1 N.

Preparação de uma curva de calibração

- Preparar soluções de concentrações sucessivas, a partir da solução inicial (Waters Amino Acid Hydrolysate standard), que tem uma concentração de 2,5 mM para todos os AA, tendo em conta as concentrações esperadas em cada uma das matrizes.

Preparação das Fases Móveis

- Solvente A – Preparar uma solução com 5% de AccQ-Tag Ultra Eluente A e 95% de água ultra pura. Filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como A. Deve ser preparado diariamente. (Colocar as linhas de solvente A1 e A2).
- Solvente B – O AccQ-Tag Ultra Eluente B está pronto a usar. Colocar as linhas de solvente directamente no frasco ou transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como B. (Colocar a linha de solvente B1).
- Solvente de lavagem da agulha, fraco (Weak) – Preparar uma solução com 5% de Acetonitrilo e 95% de água ultra pura. Misturar e filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como Weak. (Colocar as linhas de solvente Weak needle wash e seal wash).
- Solvente de lavagem da agulha, forte (Strong) – Preparar uma solução com 95% de Acetonitrilo e 5% de água ultra pura. Misturar e filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel e identificar como Strong. (Colocar as linhas de solvente Strong needle wash e B2).

Derivatização das soluções padrão e amostras

- Reconstituição do reagente de derivatização (Waters AccQ Flúor Reagent):
 1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
 2. Lavar a ponta da micropipeta, aspirando e dispensando 1 mL de reagente AccQ Flúor Reagent Diluent.
 3. Repetir uma vez o passo 2.
 4. Pipetar 1 mL de reagente AccQ Flúor Reagent Diluent para o frasco AccQ Flúor Reagent Powder. Tapar cuidadosamente.
 5. Agitar utilizando um vortex durante 10 segundos.
 6. Aquecer o frasco reconstituído na estufa a 55°C até o reagente se dissolver. Não aquecer mais do que 10 minutos.

Derivatização das soluções padrão:

1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
2. Pipetar 80 µL do reagente AccQ Flúor Borate Buffer para um vial.
3. Adicionar 10 µL da solução padrão preparada com adição de padrão interno.
4. Adicionar 20 µL do reagente AccQ Flúor Reagent reconstituído.
5. Agitar utilizando um vortex durante 10 segundos.
6. Deixar repousar 1 minuto à temperatura ambiente e colocar na estufa previamente aquecida a 55°C durante 10 minutos.
7. Proceder à análise cromatográfica.

Derivatização das Amostras:

1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
2. Pipetar 80 µL do reagente AccQ Flúor Borate Buffer para um vial.
3. Adicionar 10 µL da solução da amostra hidrolisada preparada com adição de padrão interno.
4. Adicionar 20 µL do reagente AccQ Flúor Reagent reconstituído.
5. Levar ao vortex durante 10 segundos.
6. Deixar repousar 1 minuto à temperatura ambiente e colocar na estufa previamente aquecida a 55°C durante 10 minutos.
7. Proceder à análise cromatográfica.

Parâmetro a programar para o detetor:

Parâmetros	Valor programado
Modo do comprimento de onda	Comprimento de onda único (<i>Single wavelength</i>)
Comprimento de onda	260 (nm)
Velocidade da amostragem	20 (pontos/seg)
Constante de tempo	0.40 (seg)

Gradiente a programar

	Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	%A	%B	Curva
1	0,00	0,7	99,9	0,1	
2	0,54	0,7	99,9	0,1	6
3	5,74	0,7	90,9	9,1	7
4	7,74	0,7	78,8	21,2	6
5	8,04	0,7	40,4	59,6	6
6	8,64	0,7	40,4	59,6	6
7	8,73	0,7	99,9	0,1	6
8	9,50	0,7	99,9	0,1	6

Anexo IV – Respostas obtidas para a proteína total e aminoácidos essenciais

Proteína Total

Tabela IV.1- Resultados DOE proteína total

Demolha 20°C					Demolha 30°C				
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta
1	-1 -1	-1	-1	14.2	10	-1 -1	-1	-1	15.3
2	0 -1	0	-1	10.0	11	0 -1	0	-1	15.3
3	+1 -1	+1	-1	12.4	12	+1 -1	+1	-1	13.6
4	-1 0	-1	0	12.3	13	-1 0	-1	0	15.4
5	0 0	0	0	10.2	14	0 0	0	0	12.3
6	+1 0	+1	0	10.9	15	+1 0	+1	0	11.1
7	-1 +1	-1	+1	11.6	16	-1 +1	-1	+1	13.9
8	0 +1	0	+1	13.5	17	0 +1	0	+1	12.3
9	+1 +1	+1	+1	13.6	18	+1 +1	+1	+1	14.1

Histidina

Tabela IV.2 - Resultados DOE histidina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	296.01	296.19	10	-1 -1	-1	-1	228.18	227.69
2	0 -1	0	-1	195.26	202.63	11	0 -1	0	-1	256.85	263.84
3	+1 -1	+1	-1	271.73	268.60	12	+1 -1	+1	-1	220.96	219.99
4	-1 0	-1	0	395.50	395.06	13	-1 0	-1	0	313.00	313.07
5	0 0	0	0	377.58	377.09	14	0 0	0	0	341.03	335.61
6	+1 0	+1	0	345.07	340.92	15	+1 0	+1	0	341.16	343.57
7	-1 +1	-1	+1	341.69	346.61	16	-1 +1	-1	+1	345.72	377.79
8	0 +1	0	+1	250.61	250.95	17	0 +1	0	+1	338.80	334.90
9	+1 +1	+1	+1	294.40	295.48	18	+1 +1	+1	+1	352.97	375.25

Treonina

Tabela IV.3 - Resultados DOE treonina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	483.50	486.07	10	-1 -1	-1	-1	389.80	390.92
2	0 -1	0	-1	367.61	316.54	11	0 -1	0	-1	422.75	439.54
3	+1 -1	+1	-1	466.36	462.34	12	+1 -1	+1	-1	382.30	382.49
4	-1 0	-1	0	543.29	543.34	13	-1 0	-1	0	436.93	430.98
5	0 0	0	0	517.88	526.07	14	0 0	0	0	446.71	446.65
6	+1 0	+1	0	469.17	468.46	15	+1 0	+1	0	464.86	463.36
7	-1 +1	-1	+1	459.97	465.22	16	-1 +1	-1	+1	550.08	516.96
8	0 +1	0	+1	354.81	354.76	17	0 +1	0	+1	481.41	480.43
9	+1 +1	+1	+1	394.70	399.57	18	+1 +1	+1	+1	530.78	519.42

Lisina

Tabela IV.4 - Resultados DOE lisina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	714.18	715.17	10	-1 -1	-1	-1	548.81	552.81
2	0 -1	0	-1	554.17	427.18	11	0 -1	0	-1	553.75	637.21
3	+1 -1	+1	-1	730.52	730.41	12	+1 -1	+1	-1	513.02	512.45
4	-1 0	-1	0	853.06	852.86	13	-1 0	-1	0	692.43	693.46
5	0 0	0	0	830.24	823.10	14	0 0	0	0	675.01	675.91
6	+1 0	+1	0	708.39	710.01	15	+1 0	+1	0	695.47	698.05
7	-1 +1	-1	+1	703.06	704.86	16	-1 +1	-1	+1	848.71	782.19
8	0 +1	0	+1	581.80	581.99	17	0 +1	0	+1	714.27	711.74
9	+1 +1	+1	+1	638.53	637.45	18	+1 +1	+1	+1	759.65	810.83

Metionina

Tabela IV.5 - Resultados DOE metionina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	191.92	195.25	10	-1 -1	-1	-1	140.64	139.44
2	0 -1	0	-1	140.52	102.88	11	0 -1	0	-1	168.98	157.75
3	+1 -1	+1	-1	181.89	184.19	12	+1 -1	+1	-1	151.90	148.05
4	-1 0	-1	0	259.63	257.74	13	-1 0	-1	0	203.10	199.52
5	0 0	0	0	250.01	249.74	14	0 0	0	0	219.48	220.25
6	+1 0	+1	0	219.78	219.44	15	+1 0	+1	0	244.82	244.38
7	-1 +1	-1	+1	244.88	246.52	16	-1 +1	-1	+1	266.55	256.20
8	0 +1	0	+1	168.75	168.81	17	0 +1	0	+1	212.34	212.98
9	+1 +1	+1	+1	206.75	208.05	18	+1 +1	+1	+1	240.21	271.91

Valina

Tabela IV.6 - Resultados DOE valina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	522.47	520.91	10	-1 -1	-1	-1	422.42	424.14
2	0 -1	0	-1	400.45	353.36	11	0 -1	0	-1	455.69	477.40
3	+1 -1	+1	-1	500.61	500.61	12	+1 -1	+1	-1	413.40	412.67
4	-1 0	-1	0	661.84	661.57	13	-1 0	-1	0	536.75	537.81
5	0 0	0	0	651.32	652.59	14	0 0	0	0	554.70	556.57
6	+1 0	+1	0	584.99	583.70	15	+1 0	+1	0	506.07	505.87
7	-1 +1	-1	+1	514.94	516.28	16	-1 +1	-1	+1	562.24	606.45
8	0 +1	0	+1	427.52	426.81	17	0 +1	0	+1	622.97	619.57
9	+1 +1	+1	+1	459.74	463.15	18	+1 +1	+1	+1	572.25	550.80

Isoleucina

Tabela IV.7 - Resultados DOE isoleucina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	377.25	378.64	10	-1 -1	-1	-1	305.82	303.61
2	0 -1	0	-1	287.07	255.19	11	0 -1	0	-1	328.04	341.10
3	+1 -1	+1	-1	358.34	358.24	12	+1 -1	+1	-1	294.21	295.34
4	-1 0	-1	0	501.89	502.32	13	-1 0	-1	0	404.89	403.65
5	0 0	0	0	495.06	493.76	14	0 0	0	0	418.51	416.82
6	+1 0	+1	0	441.74	442.46	15	+1 0	+1	0	359.29	360.44
7	-1 +1	-1	+1	371.63	371.63	16	-1 +1	-1	+1	424.23	473.95
8	0 +1	0	+1	318.33	317.43	17	0 +1	0	+1	464.22	467.00
9	+1 +1	+1	+1	325.70	327.87	18	+1 +1	+1	+1	434.18	479.25

Leucina

Tabela IV.8 - Resultados DOE leucina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combinação	Temperatura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	926.89	928.83	10	-1 -1	-1	-1	764.49	762.46
2	0 -1	0	-1	720.31	645.67	11	0 -1	0	-1	822.23	853.17
3	+1 -1	+1	-1	887.78	887.30	12	+1 -1	+1	-1	744.18	742.74
4	-1 0	-1	0	1033.14	1034.19	13	-1 0	-1	0	839.72	835.33
5	0 0	0	0	1015.94	1015.29	14	0 0	0	0	868.69	867.81
6	+1 0	+1	0	909.99	911.99	15	+1 0	+1	0	867.81	868.37
7	-1 +1	-1	+1	885.29	886.38	16	-1 +1	-1	+1	1028.95	1026.16
8	0 +1	0	+1	678.43	678.21	17	0 +1	0	+1	935.31	937.70
9	+1 +1	+1	+1	780.97	783.14	18	+1 +1	+1	+1	999.26	1023.54

Fenilalanina

Tabela IV.9 - Resultados DOE fenilalanina

Demolha 20°C						Demolha 30°C					
Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2	Exp.	Combina ção	Temperat ura	Tempo	Resposta 1	Resposta 2
1	-1 -1	-1	-1	646.92	646.86	10	-1 -1	-1	-1	520.22	520.97
2	0 -1	0	-1	466.95	445.33	11	0 -1	0	-1	592.74	597.65
3	+1 -1	+1	-1	590.75	591.60	12	+1 -1	+1	-1	520.42	519.20
4	-1 0	-1	0	749.29	750.22	13	-1 0	-1	0	584.88	584.47
5	0 0	0	0	721.83	721.90	14	0 0	0	0	641.29	641.63
6	+1 0	+1	0	647.20	647.05	15	+1 0	+1	0	647.29	648.95
7	-1 +1	-1	+1	643.69	643.32	16	-1 +1	-1	+1	757.28	680.34
8	0 +1	0	+1	441.85	441.78	17	0 +1	0	+1	639.34	638.41
9	+1 +1	+1	+1	558.05	558.27	18	+1 +1	+1	+1	665.59	686.24

Anexo V – Análise dos pressupostos da variância

Proteína (Soma aminoácidos)

Box-Cox

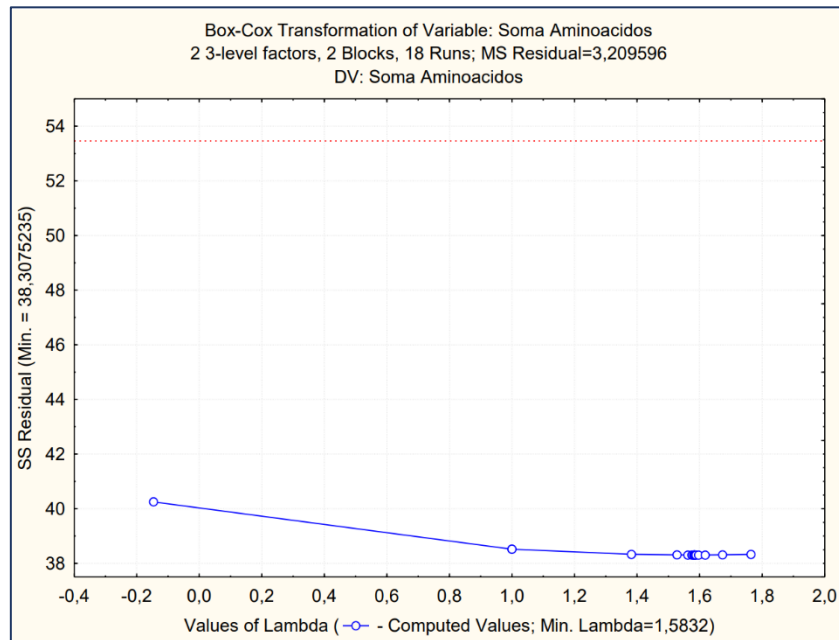


Figura V.1 - Verificação de Box-Cox para a proteína (enquanto soma dos AA)

Normalidade

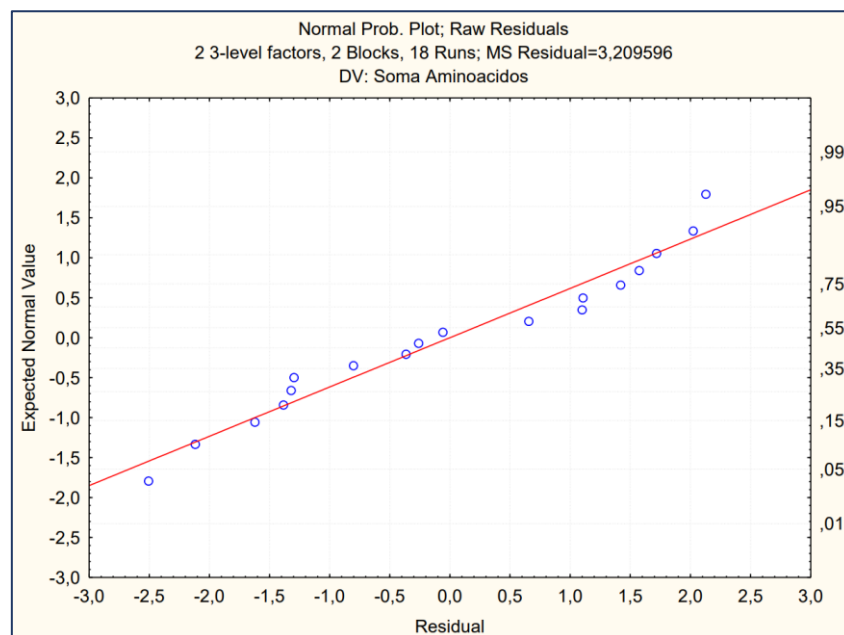


Figura V.2 - Verificação da normalidade para a proteína (enquanto soma dos AA)

Variância

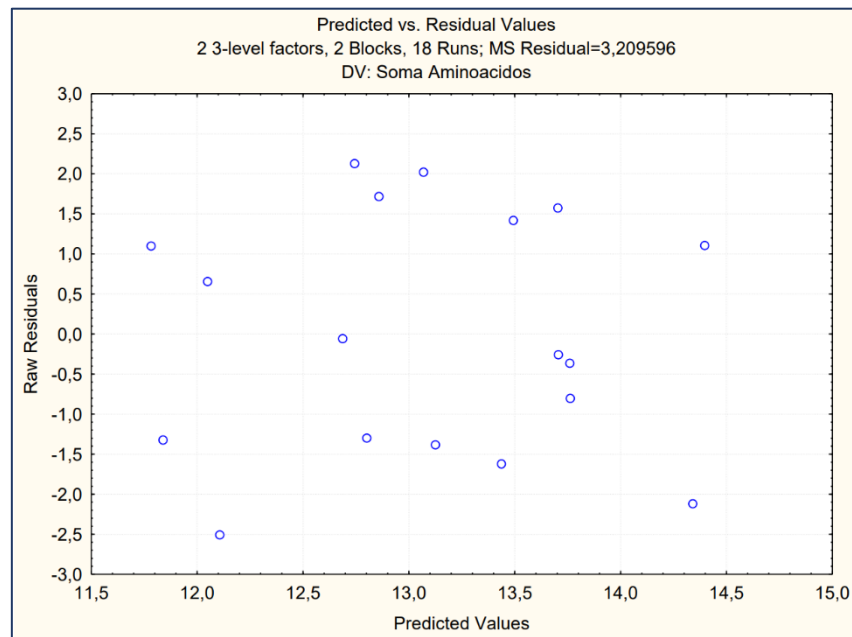


Figura V.3 - Verificação da homogeneidade da variância para a proteína (enquanto soma dos AA)

Histidina

Box-Cox

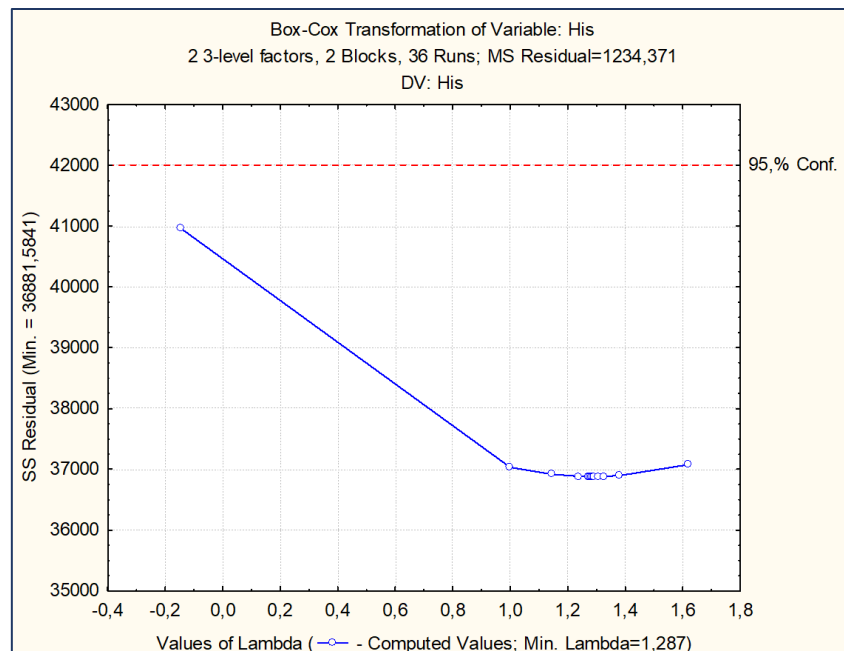


Figura V.4 - Verificação de Box-Cox para a histidina

Normalidade

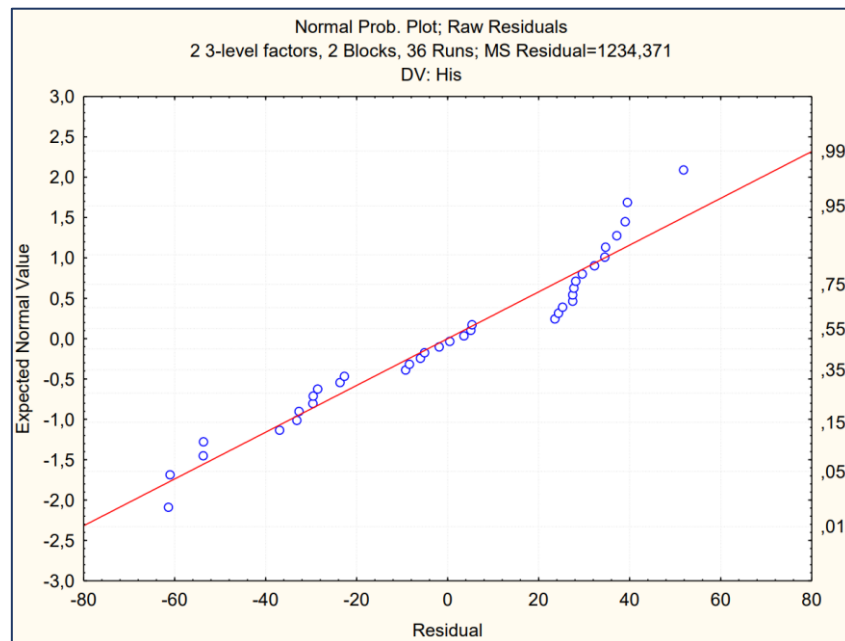


Figura V.5 - Verificação da normalidade para a histidina

Variância

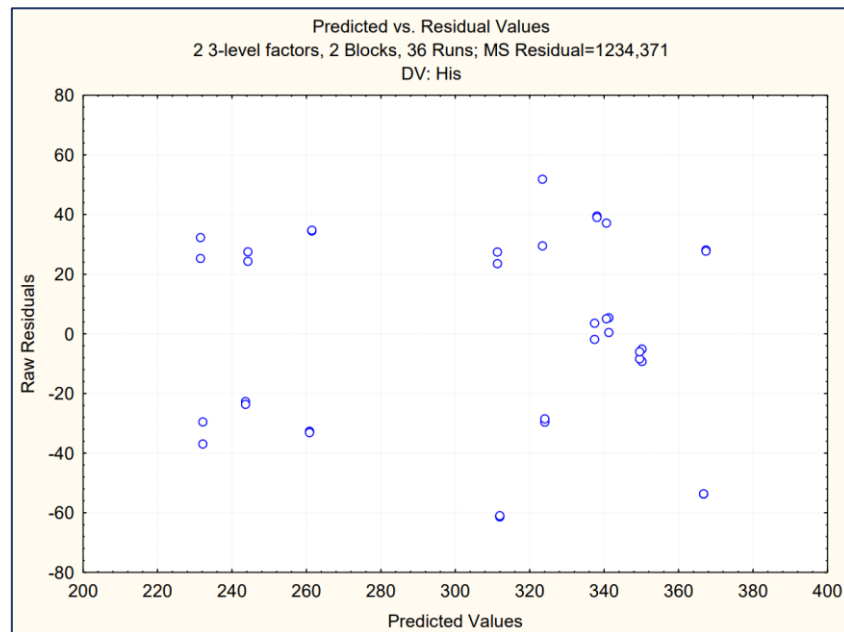


Figura V.6 - Verificação da homogeneidade da variância para a histidina

Treonina

Box-Cox

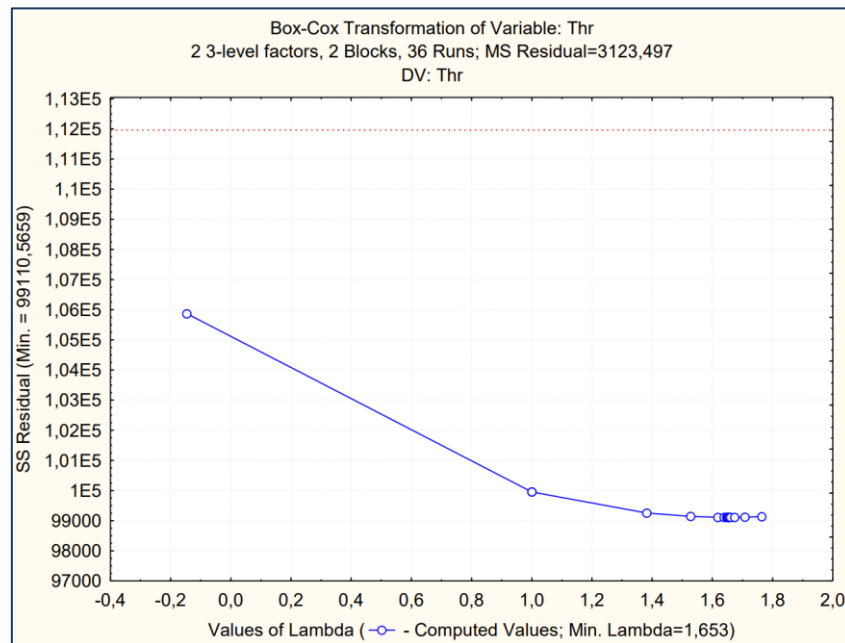


Figura V.7 - Verificação de Box-Cox para a histidina

Normalidade

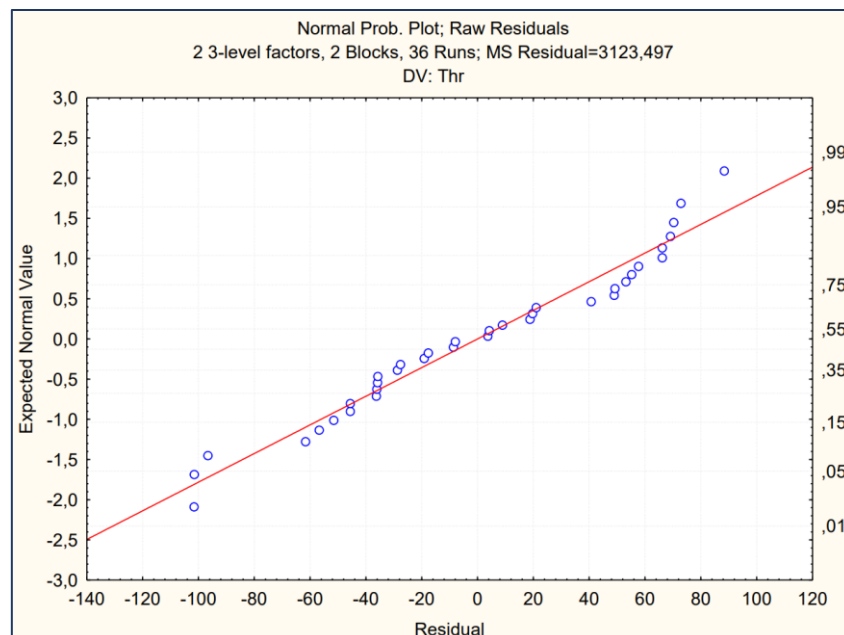


Figura V.8 - Verificação da normalidade para a treonina

Variância

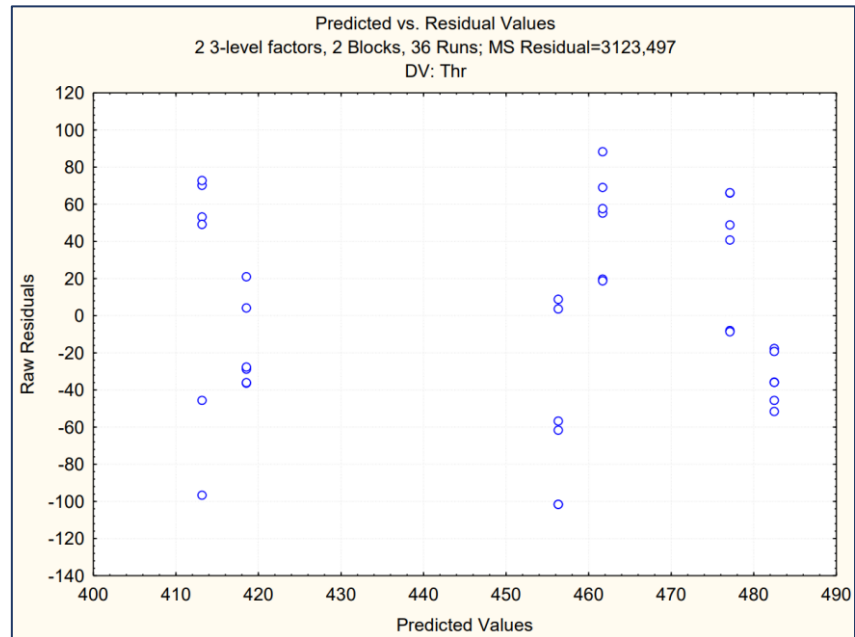


Figura V.9 - Verificação da homogeneidade da variância para a treonina

Lisina

Box-Cox

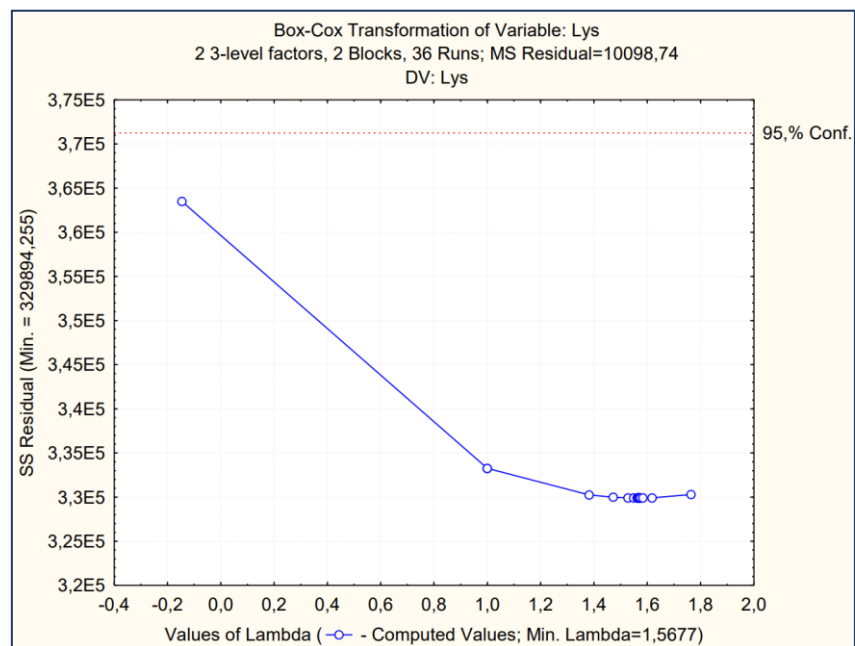


Figura V.10 - Verificação de Box-Cox para a lisina

Normalidade

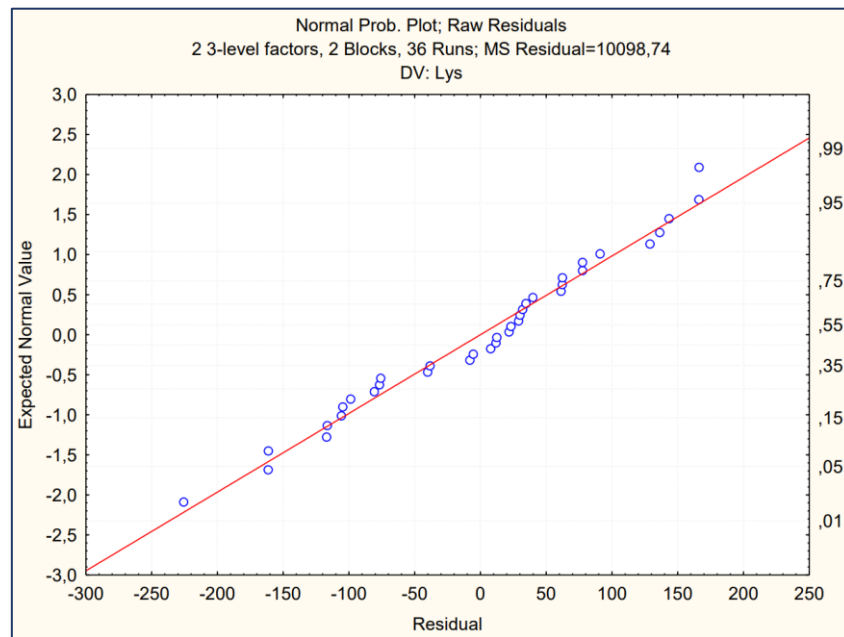


Figura V.11 - Verificação da normalidade para a lisina

Variância

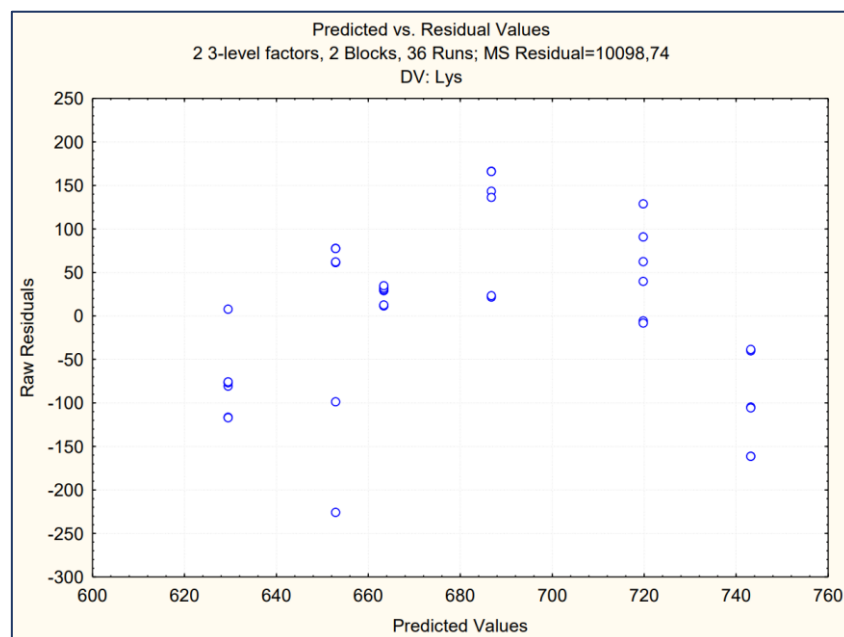


Figura V.12 - Verificação da homogeneidade da variância para a lisina

Metionina

Box-Cox

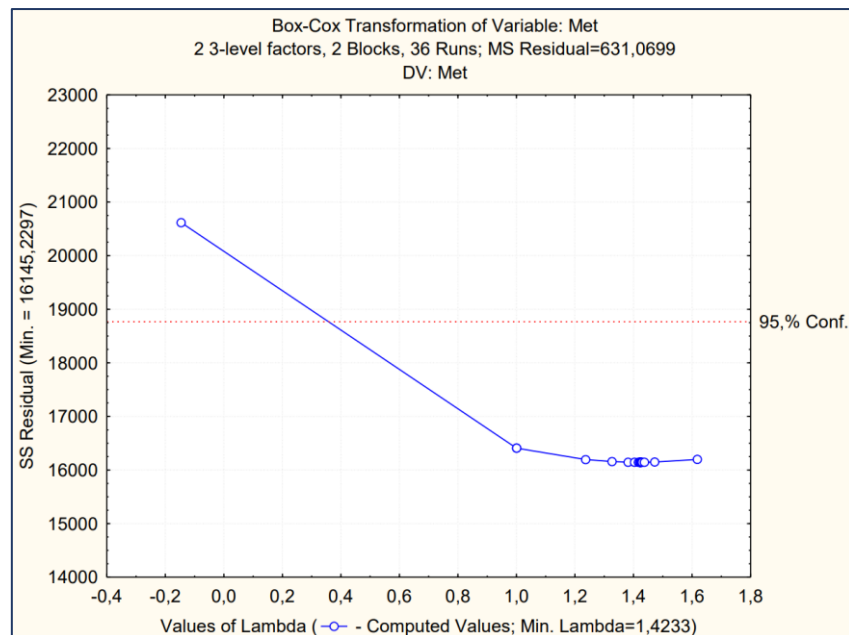


Figura V.13 - Verificação de Box-Cox para a metionina

Normalidade

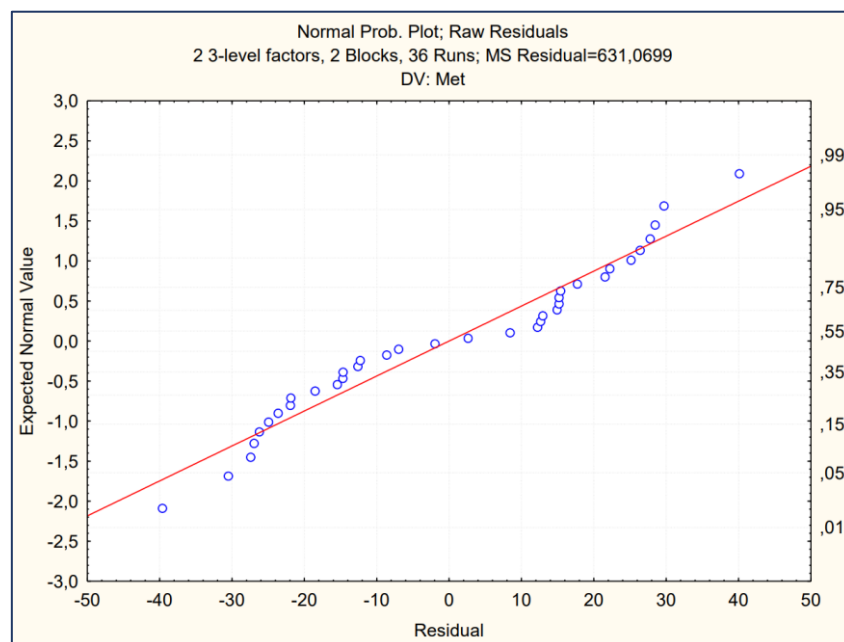


Figura V.14 - Verificação da normalidade para a metionina

Variância

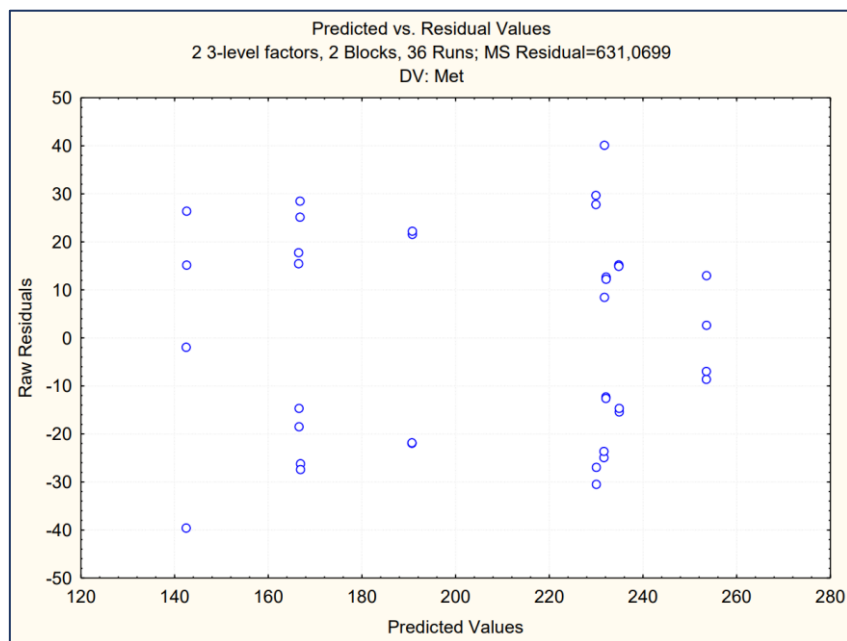


Figura V.15 - Verificação da homogeneidade da variância para a metionina

Valina

Box-Cox

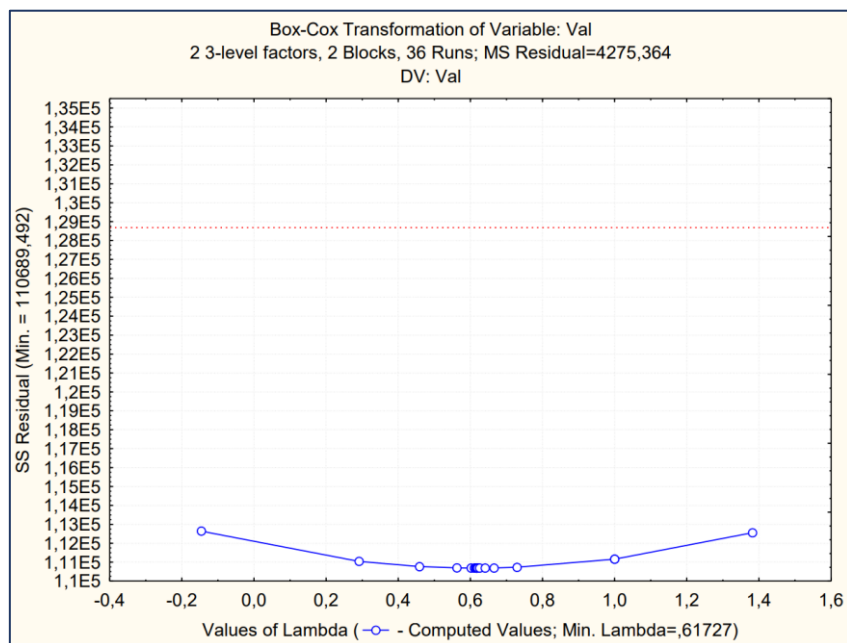


Figura V.16 - Verificação de Box-Cox para a valina

Normalidade

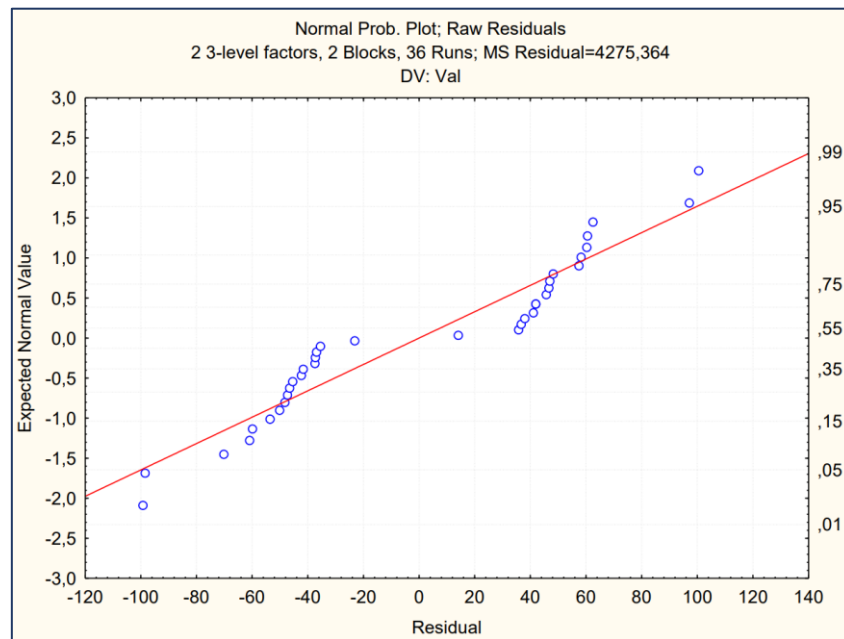


Figura V.17 - Verificação da normalidade para a valina

Variância

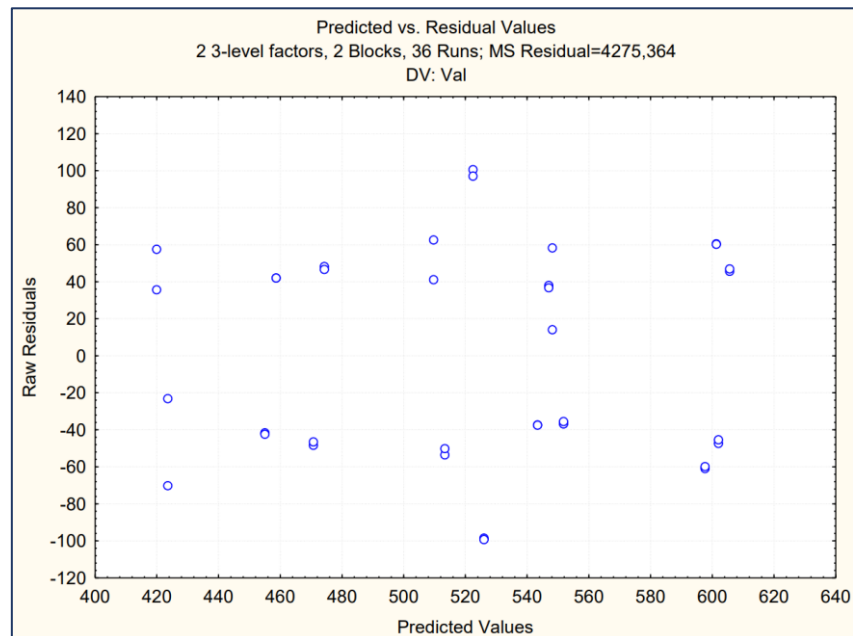


Figura V.18 - Verificação da homogeneidade da variância para a valina

Isoleucina

Box-Cox

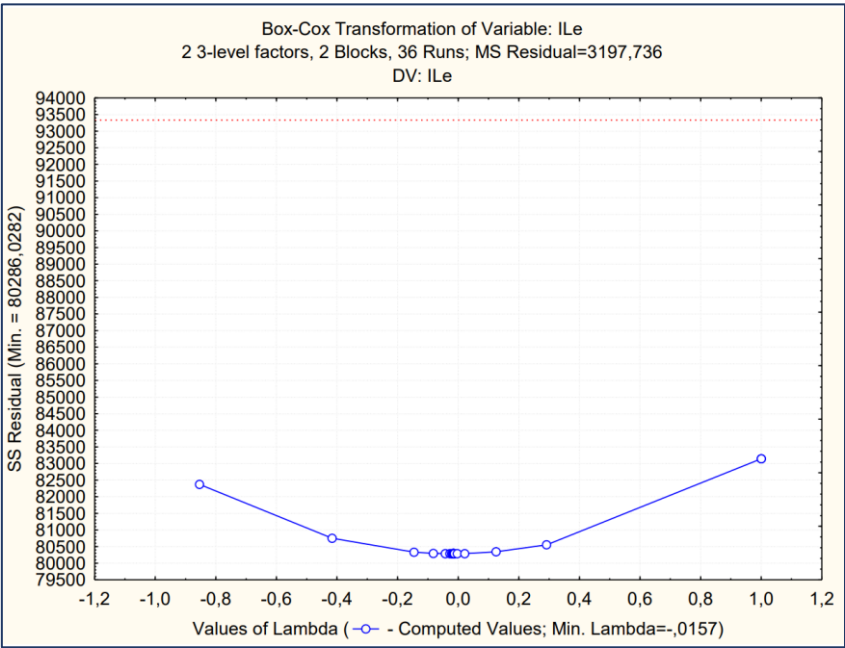


Figura V.19 - Verificação de Box-Cox para a isoleucina

Normalidade

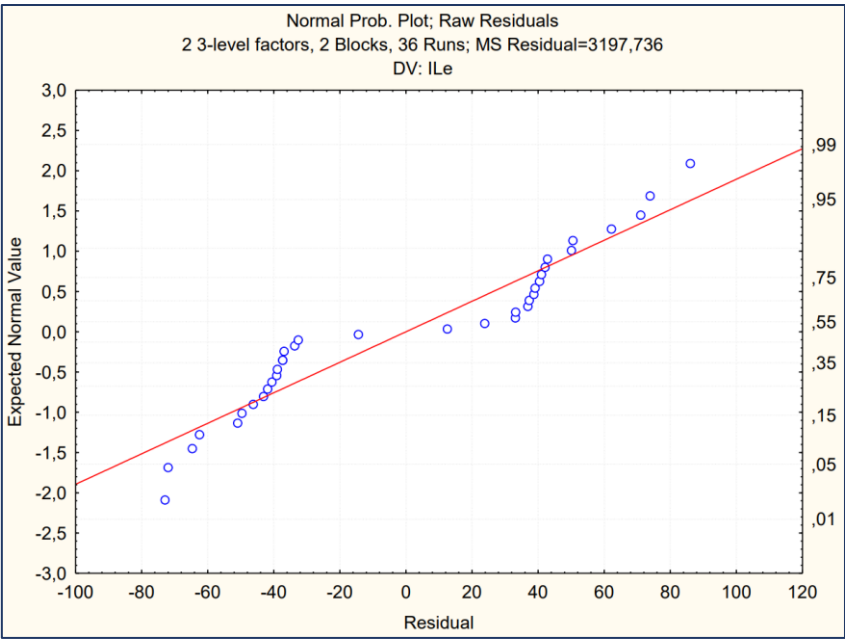


Figura V.20 - Verificação da normalidade para a isoleucina

Variância

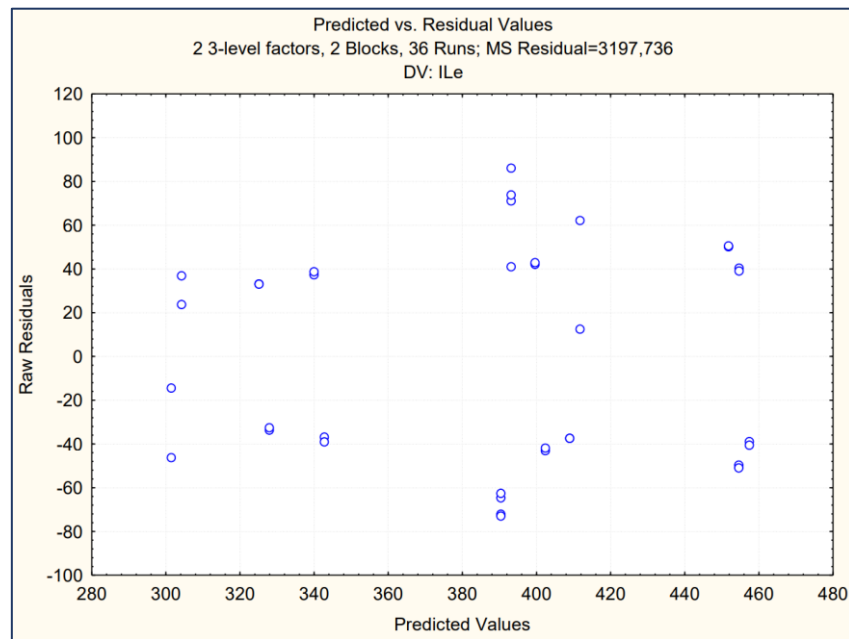


Figura V.21 - Verificação da homogeneidade da variância para a isoleucina

Leucina

Box-Cox

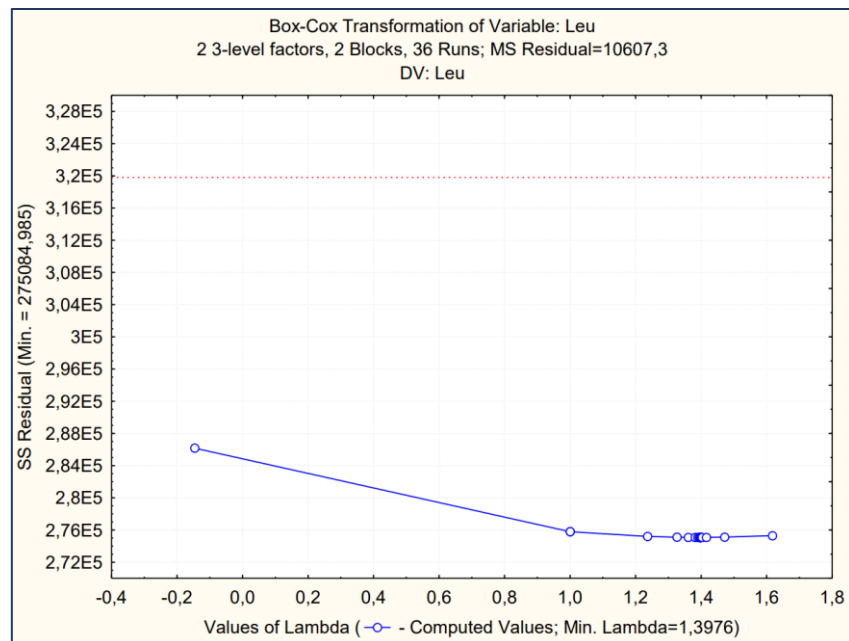


Figura V.22 - Verificação de Box-Cox para a leucina

Normalidade

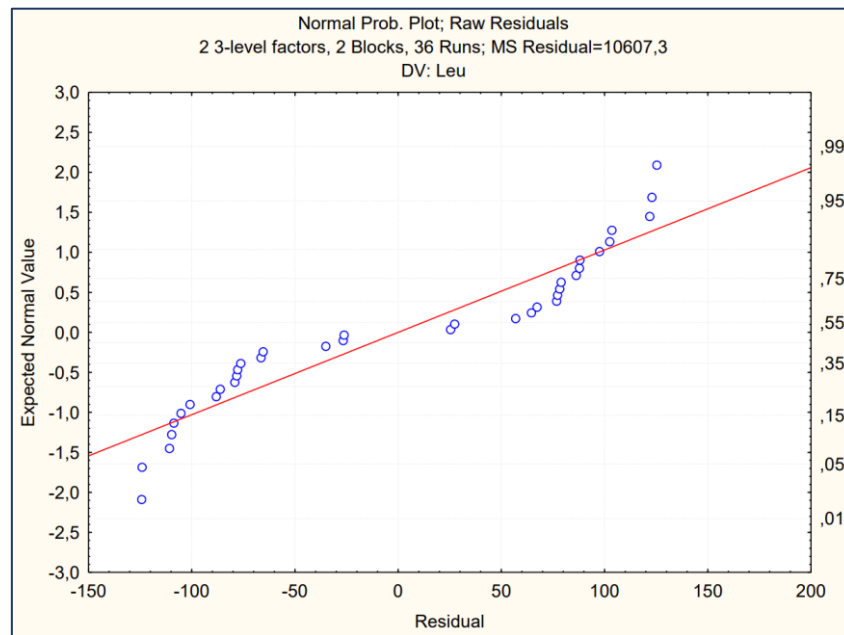


Figura V.23 - Verificação da normalidade para a leucina

Variância

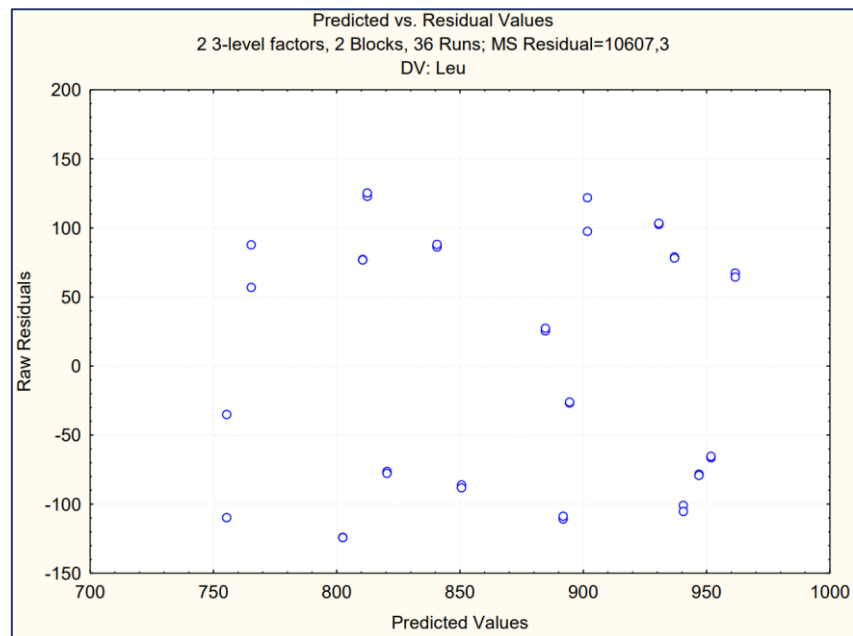


Figura V.24 - Verificação da homogeneidade da variância para a leucina

Fenilalanina

Box-Cox

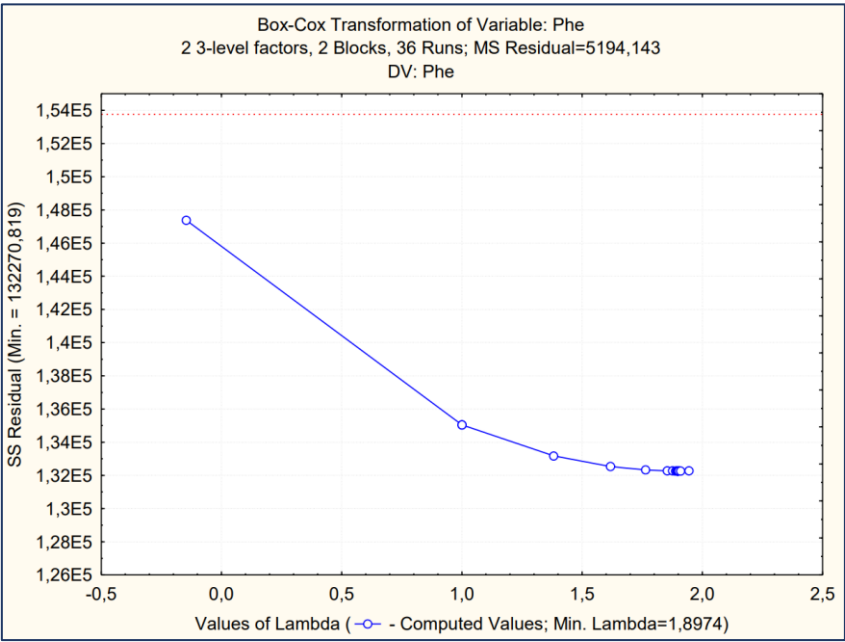


Figura V.25 - Verificação de Box-Cox para a fenilalanina

Normalidade



Figura V.26 - Verificação da normalidade para a fenilalanina

Variância

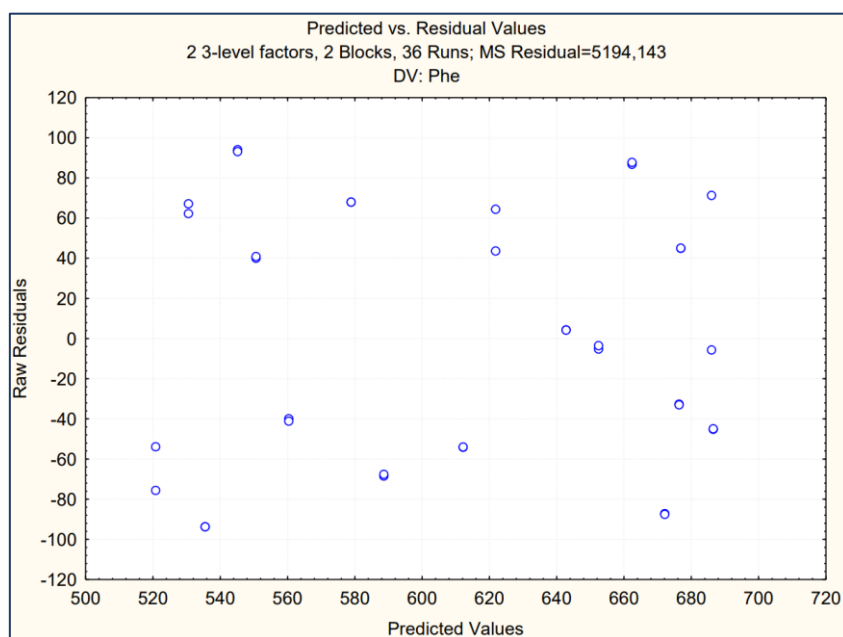


Figura V.27 - Verificação da homogeneidade da variância para a fenilalanina

Anexo VI – ANOVA, ANOVA condensada e superfícies de resposta

Proteína total

ANOVA

Tabela VI.10 - ANOVA para a proteína total

ANOVA; Var.:Proteína; R-sqr=,7129; Adj.:38992 (Statistica_Proteína) 2 3-level factors, 2 Blocks, 18 Runs; MS Residual=1,774197 DV: Proteína					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	12,00810	1	12,00810	6,768190	0,031541
(1)Tempo Germinacao L+Q	6,87316	2	3,43658	1,936979	0,206053
(2)Temperatura Germinacao L+Q	7,56560	2	3,78280	2,132121	0,181049
1*2	8,79752	4	2,19938	1,239649	0,367579
Error	14,19357	8	1,77420		
Total SS	49,43796	17			

ANOVA condensada

Tabela VI.11 - ANOVA condensada para a proteína total

ANOVA; Var.:Proteína; R-sqr=,37643; Adj.:29329 (Statistica_Proteína) 2 3-level factors, 2 Blocks, 18 Runs; MS Residual=2,055208 DV: Proteína					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	12,00810	1	12,00810	5,842766	0,028839
Tempo Germinacao(Q)	6,60174	1	6,60174	3,212202	0,093280
Error	30,82812	15	2,05521		
Total SS	49,43796	17			

Superfície de resposta

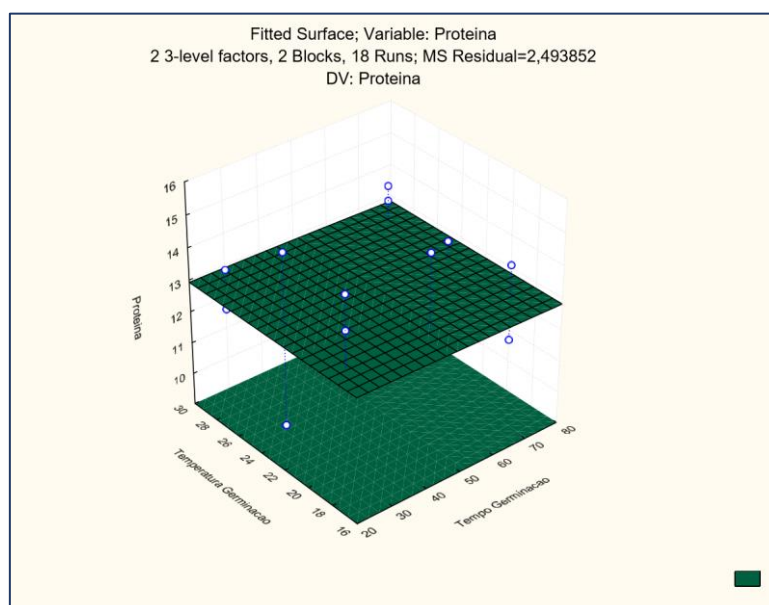


Figura VI.28 - Superfície de resposta para a proteína total

Proteína total sem blocos

ANOVA – Demolha 20°C

Tabela VI.12 - ANOVA para a proteína total (demolha a 20°C)

	ANOVA; Var.:Proteina; R-sqr=.4443; Adj:0, (Statistica_Proteina) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=2,596219 DV: Proteina Include cases: 1:9				
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tempo Germinacao L+Q	4,72000	2	2,360001	0,909014	0,472681
(2)Temperatura Germinacao L+Q	3,58311	2	1,791553	0,690062	0,552758
Error	10,38488	4	2,596219		
Total SS	18,68798	8			

ANOVA – Demolha 30°C

Tabela VI.13 - ANOVA para a proteína total (demolha a 30°C)

	ANOVA; Var.:Proteina; R-sqr=.61149; Adj:.,22298 (Statistica_Proteina) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=1,820353 DV: Proteina Include cases: 10:18				
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tempo Germinacao L+Q	5,21884	2	2,609419	1,433469	0,339308
(2)Temperatura Germinacao L+Q	6,24163	2	3,120813	1,714400	0,289923
Error	7,28141	4	1,820353		
Total SS	18,74188	8			

Proteína (Soma dos AA)

ANOVA

Tabela VI.14 - ANOVA para a proteína total (enquanto soma dos AA)

	ANOVA; Var.:Soma Aminoacidos; R-sqr=.22144; Adj:0, (Statistica_Proteina) 2 3-level factors, 2 Blocks, 18 Runs; MS Residual=3,209596 DV: Soma Aminoacidos				
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	0,01433	1	0,014334	0,004466	0,947819
(1)Tempo Germinacao L+Q	2,58987	2	1,294937	0,403458	0,676737
(2)Temperatura Germinacao L+Q	8,35048	2	4,175242	1,300862	0,308079
Error	38,51516	12	3,209596		
Total SS	49,46985	17			

Superfície de resposta

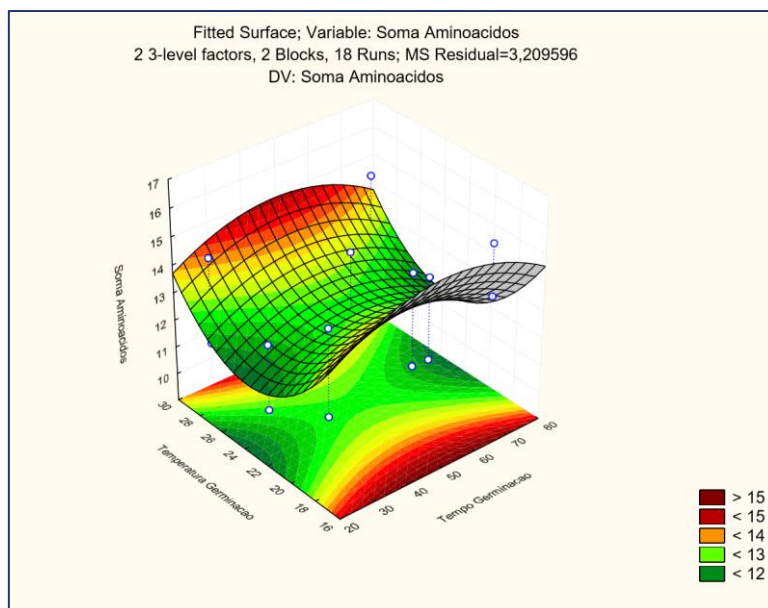


Figura VI.29 - Superfície de resposta para a proteína total (enquanto soma dos AA)

Treonina

ANOVA

Tabela VI.15 - ANOVA para a treonina

ANOVA; Var.:Thr; R-sqr=,3605; Adj.:,13913 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=3093,086 DV: Thr					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	259,9	1	259,87	0,084015	0,774228
(1)Tempo Germinação L+Q	25542,2	2	12771,11	4,128922	0,027719
(2)Temperatura de Germinação L+Q	12264,0	2	6132,02	1,982493	0,158005
1*2	7267,6	4	1816,91	0,587409	0,674631
Error	80420,2	26	3093,09		
Total SS	125754,0	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.16 - ANOVA condensada para a treonina

ANOVA; Var.:Thr; R-sqr=,11631; Adj.:,06275 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=3367,495 DV: Thr					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	259,9	1	259,87	0,077169	0,782905
Tempo Germinação(Q)	14366,8	1	14366,79	4,266315	0,046802
Error	111127,3	33	3367,50		
Total SS	125754,0	35			

Superfície de resposta

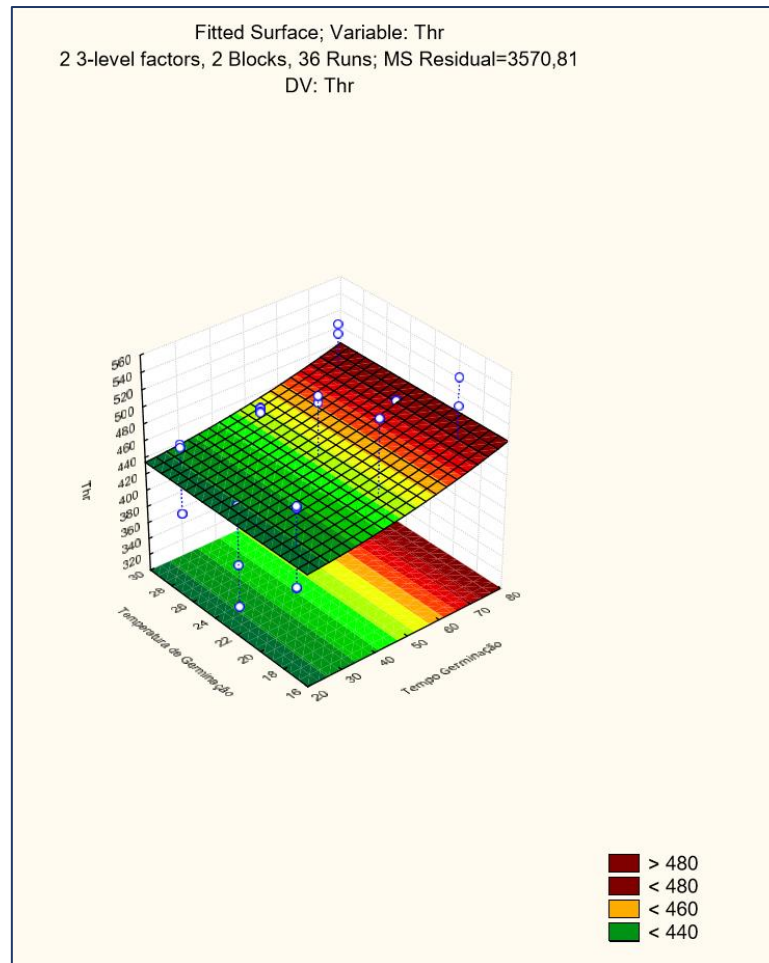


Figura VI.30 - Superfície de resposta para a treonina

Lisina

ANOVA

Tabela VI.17 - ANOVA para a lisina

ANOVA; Var.:Lys; R-sqr=,49668; Adj.:32245 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=7513,543 DV: Lys					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	4928,8	1	4928,78	0,655986	0,425332
(1)Tempo Germinação L+Q	133113,9	2	66556,95	8,858264	0,001165
(2)Temperatura de Germinação L+Q	33659,2	2	16829,59	2,239901	0,126618
1*2	21071,3	4	5267,81	0,701109	0,598251
Error	195352,1	26	7513,54		
Total SS	388125,2	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.18 - ANOVA condensada para a lisina

ANOVA; Var.:Lys; R-sqr=,35567; Adj.:29526 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=7815,08 DV: Lys					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	4928,8	1	4928,78	0,630675	0,432958
(1)Tempo Germinação L+Q	133113,9	2	66556,95	8,516477	0,001083
Error	250082,6	32	7815,08		
Total SS	388125,2	35			

Superfície de resposta

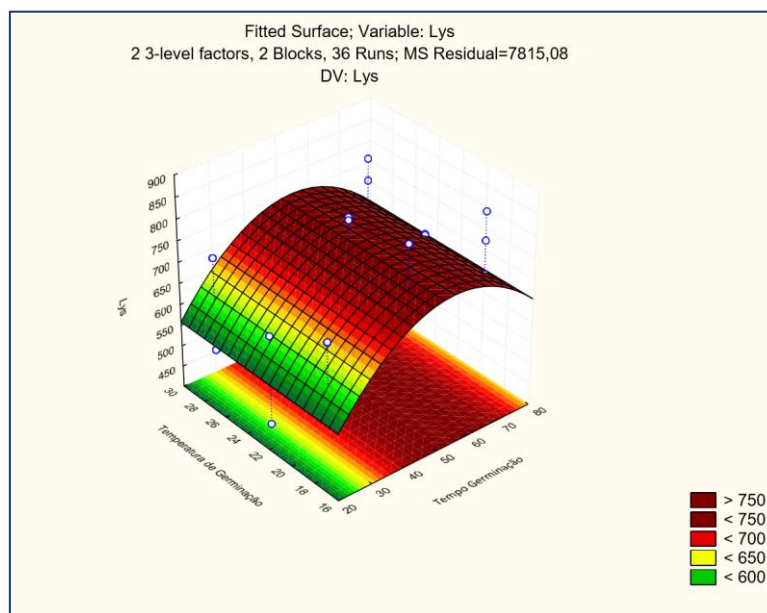


Figura VI.31 - Superfície de resposta para a lisina

Valina

ANOVA

Tabela VI.19 - ANOVA para a valina

ANOVA; Var.:Val; R-sqr=,52647; Adj.:36255 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=4275,364 DV: Val					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	117,9	1	117,88	0,02757	0,869401
(1)Tempo Germinação L+Q	106438,4	2	53219,20	12,44788	0,000161
(2)Temperatura de Germinação L+Q	8134,2	2	4067,09	0,95128	0,399281
1*2	8894,3	4	2223,56	0,52009	0,721716
Error	111159,5	26	4275,36		
Total SS	234744,2	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.20 - ANOVA condensada para valina

ANOVA; Var.:Val; R-sqr=,45393; Adj:,40273 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=4005,872 DV: Val					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	117,9	1	117,88	0,02943	0,864875
(1)Tempo Germinação L+Q	106438,4	2	53219,20	13,28530	0,000063
Error	128187,9	32	4005,87		
Total SS	234744,2	35			

Superfície de resposta

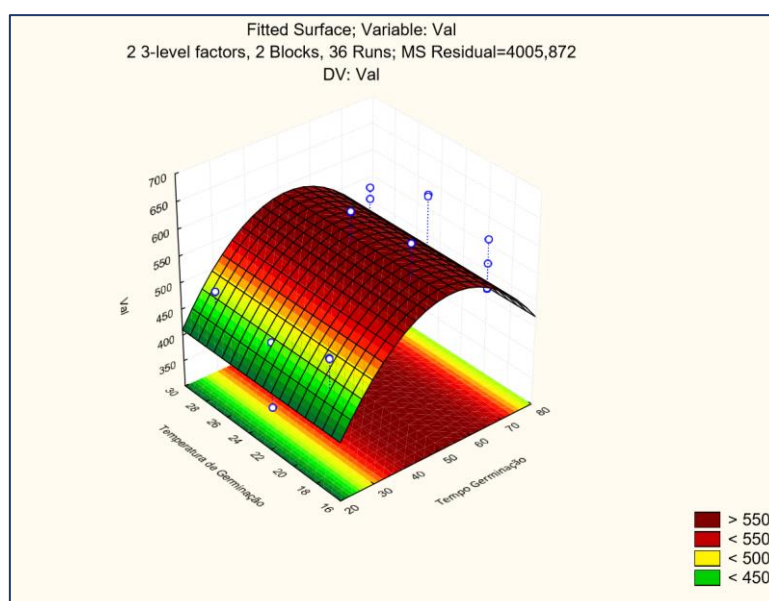


Figura VI.32 - Superfície de resposta para a valina

Isoleucina

ANOVA

Tabela VI.21 - ANOVA para a isoleucina

ANOVA; Var.:Ile; R-sqr=,52274; Adj:,35754 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=3197,736 DV: Ile					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	69,4	1	69,39	0,02170	0,884023
(1)Tempo Germinação L+Q	79371,4	2	39685,71	12,41057	0,000164
(2)Temperatura de Germinação L+Q	5002,9	2	2501,46	0,78226	0,467841
1*2	6621,0	4	1655,24	0,51763	0,723451
Error	83141,1	26	3197,74		
Total SS	174205,8	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.22 - ANOVA condensada para a isoleucina

ANOVA; Var.: ILe; R-sqr=,45602; Adj.:40502 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=2961,407 DV: ILe					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	69,4	1	69,39	0,02343	0,879300
(1)Tempo Germinação L+Q	79371,4	2	39685,71	13,40096	0,000059
Error	94765,0	32	2961,41		
Total SS	174205,8	35			

Superfície de resposta

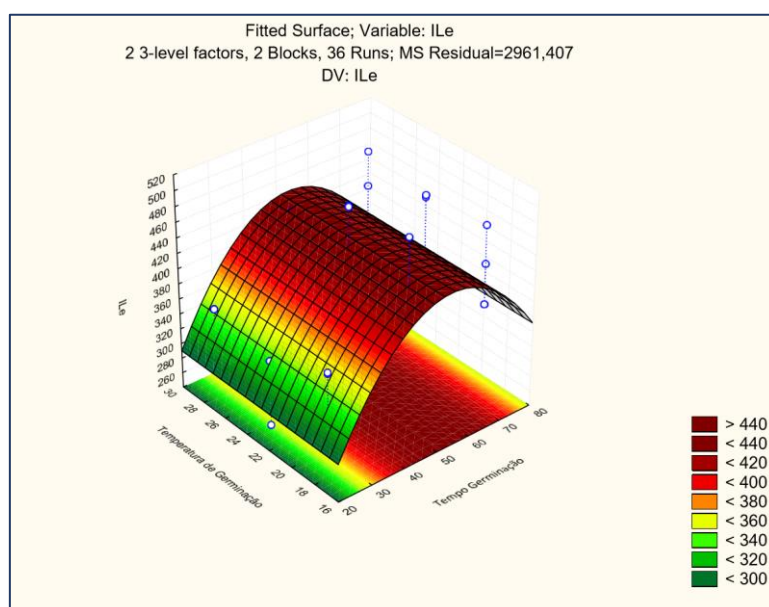


Figura VI.33 - Superfície de resposta para a isoleucina

Leucina

ANOVA

Tabela VI.23 - ANOVA para a leucina

ANOVA; Var.: Leu; R-sqr=,35394; Adj.:1303 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=10607,3 DV: Leu					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	881,8	1	881,82	0,083133	0,775382
(1)Tempo Germinação L+Q	83543,3	2	41771,63	3,938007	0,032067
(2)Temperatura de Germinação L+Q	35170,9	2	17585,44	1,657861	0,210061
1*2	31493,6	4	7873,40	0,742262	0,571883
Error	275789,9	26	10607,30		
Total SS	426879,4	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.24 - ANOVA condensada para a leucina

ANOVA; Var.:Leu; R-sqr=,10832; Adj:.,05428 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=11534,48 DV: Leu					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	881,8	1	881,82	0,076451	0,783891
Tempo Germinação(Q)	45359,8	1	45359,81	3,932542	0,055734
Error	380637,8	33	11534,48		
Total SS	426879,4	35			

Superfície de resposta

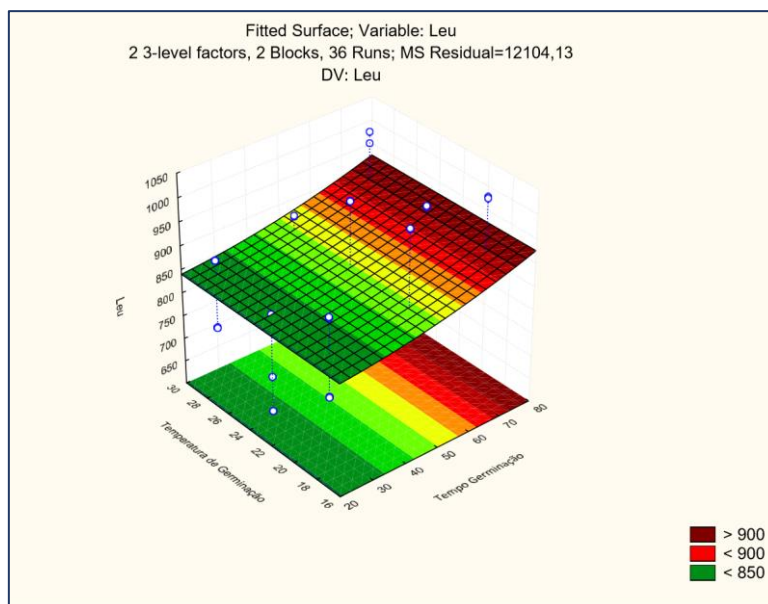


Figura VI.34 – Superfície de resposta para a leucina

Fenilalanina

ANOVA

Tabela VI.25 - ANOVA para a fenilalanina

	ANOVA; Var.:Phe; R-sqr=,47674; Adj.:29561 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=5194,143 DV: Phe				
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	841,4	1	841,38	0,161986	0,690625
(1)Tempo Germinação L+Q	73357,0	2	36678,49	7,061509	0,003553
(2)Temperatura de Germinação L+Q	23025,4	2	11512,72	2,216480	0,129175
1*2	25816,9	4	6454,23	1,242598	0,317535
Error	135047,7	26	5194,14		
Total SS	258088,4	35			

ANOVA condensada

Tabela VI.26 - ANOVA condensada para a fenilalanina

	ANOVA; Var.:Phe; R-sqr=,20961; Adj.:16171 (Aminoacidos_20181124) 2 3-level factors, 2 Blocks, 36 Runs; MS Residual=6181,507 DV: Phe				
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	841,4	1	841,38	0,136112	0,714534
Tempo Germinação(Q)	53257,3	1	53257,31	8,615587	0,006027
Error	203989,7	33	6181,51		
Total SS	258088,4	35			

Superfície de resposta

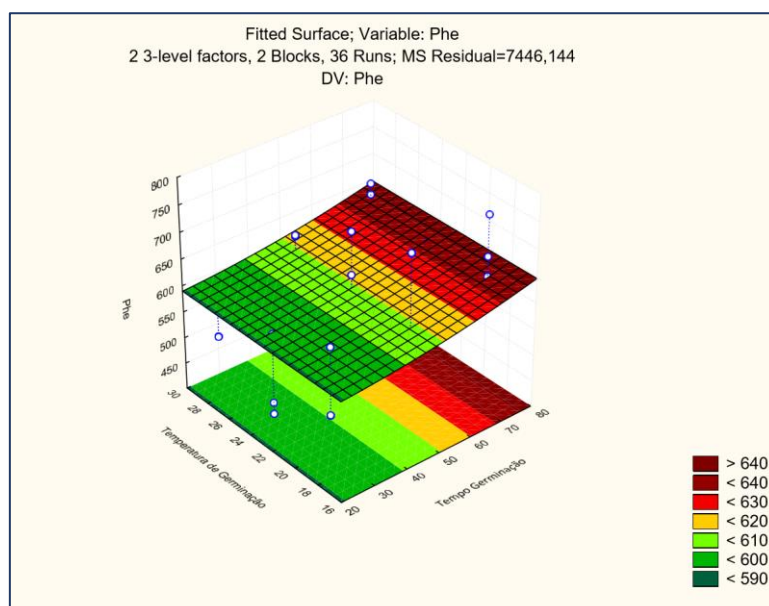


Figura VI.35 - Superfície de resposta para a fenilalanina

Anexo VII – Contagem de bolores e leveduras enquanto parâmetro de controlo da qualidade

Leveduras

Tabela VII.27 - Nº leveduras por mL ao longo da germinação

Temperatura de demolha (°C)	Temperatura de germinação (°C)	Duração da germinação (h)	Nº total microrganismos/mL
20	18	24	3E+01
20	18	48	3E+02
20	18	72	7E+02
20	23	24	1E+02
20	23	48	3E+02
20	23	72	1E+04
20	28	24	2E+01
20	28	48	2E+03
20	28	72	1E+04
30	18	24	1E+03
30	18	48	2E+03
30	18	72	3E+03
30	23	24	2E+01
30	23	48	2E+03
30	23	72	7E+04
30	28	24	5E+02
30	28	48	3E+03
30	28	72	3E+04

Bolores

Tabela VII.28 - Nº bolores por mL ao longo da germinação

Temperatura de demolha (°C)	Temperatura de germinação (°C)	Duração da germinação (h)	Nº total microrganismos/mL
20	18	24	3E+01
20	18	48	3E+01
20	18	72	4E+01
20	23	24	0E+00
20	23	48	7E+01
20	23	72	7E+02
20	28	24	3E+01
20	28	48	1E+02
20	28	72	1E+02
30	18	24	0E+00
30	18	48	0E+00
30	18	72	7E+01
30	23	24	3E+01
30	23	48	1E+01
30	23	72	2E+01
30	28	24	2E+01
30	28	48	7E+01
30	28	72	4E+01